

■短 報■ 2005 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ポリエステルの微生物分解  
-*Ralstonia metallidurans* における PHB 結合蛋白質の役割の検討-

齊藤光實<sup>1,2,3</sup>

Nature of Poly(3-hydroxybutyrate) Inclusion Body-Binding Proteins in  
*Ralstonia metalidurans* CH34

Terumi Saito<sup>1,2,3</sup>

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

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

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E. mail: 43saito-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** The genes of two poly(3-hydroxybutyrate) inclusion body-binding proteins (GAP1 and GAP2) were cloned from *Ralstonia metallidurans* CH34, and their gene products were purified. The molecular masses of GAP1 and GAP2 were 24 kDa and 18 kDa, respectively. GAP1 comprised the major part of proteins in the PHB inclusion body of *R. metallidurans* and its amino acid sequence was quite similar to that of Phasin of *R. eutropha* H16. These results indicate that GAP1 probably play the role of the major protective protein of the inclusion body. The content of GAP2 in the PHB inclusion body of *R. metallidurans* was very small. Although GAP2 accelerated the degradation of the PHB inclusion body in a similar manner to Apd from *Rhodospirillum rubrum*, the physiological role of GAP2 was not clear.

**Keywords:** poly(3-hydroxybutyrate), PHB, PHB-binding protein, *Ralstonia metallidurans*

## 序論

生分解性ポリエステルであるポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) の細胞内での合成と分解の機作を解明する基礎的知見を得るために、PHB 封入体に結合する蛋白質の性質とその役割について検討した。

細胞内に蓄積される PHB は封入体として存在し、その周りを数種類の蛋白質が覆っている。PhaP は最もよく研究されている蛋白質で *R. eutropha* では PHB 封入体蛋白質の 90%以上を占め、その発現量が封入体の大きさと数に影響を及ぼしている。*R. rubrum* では ApdA と呼ばれる PHB 分解の活性を促進する因子が知られていたが<sup>1),2)</sup>、最近になって PHB 封入体上に存在しており PhaP と同様の役割を果たしているのではないかと報告されている<sup>3)</sup>。

*Ralstonia metallidurans* は PHB 蓄積菌のモデル生物である *R. eutropha* の近縁種であり、現在ゲノムプロジェクトにより全塩基配列の決定が行われている。BLAST 検索の結果、これまでに解析されている *R. metallidurans* の塩基配列中には *R.*

*eutropha* で見ついている PHB 代謝系の蛋白質が見つかり、更に *R. rubrum* の ApdA のアミノ酸配列と類似性を示す蛋白質も見つかった。ApdA の細胞内での働きは未だ不明な点が多く、活性促進作用が報告されていることから PHB 分解の調節に関わっているのではないかと考えられる。本研究では *R. eutropha* の PhaP、*R. rubrum* の ApdA と類似のアミノ酸配列を持つものをそれぞれ GAP1、GAP2 とし、遺伝子のクローニングを行った後に大腸菌で発現させた蛋白質を精製してその性質を検討した。また、これらの遺伝子の大量発現株を作成して PHB の蓄積量と形態に及ぼす影響を調べた。

## 材料と方法

*Ralstonia metallidurans* CH34 は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。GAP1 と GAP2 の遺伝子はゲノムプロジェクトの塩基配列を基にクローニングした。クローニングした両遺伝子

が発現する蛋白質のカルボキシル末端にヒスチジン標識を付けて大腸菌で発現させ、発現蛋白質をニッケルカラムで精製した。

## 結果と討論

GAP1、GAP2とも *R. metallidurans* の細胞内で発現しており、その量は GAP1 が全封入体蛋白質の70%以上を占めているのに対して GAP2 はごくわずかであった。GAP1 と GAP2 の分子質量はそれぞれ 24 kDa と 18 kDa であった。GAP2 は ApdA と同様に活性促進作用を示したが GAP1 は阻害作用を示した。活性促進作用がどのようにして起こるかを調べる為に抽出した PHB 封入体 (native PHB) を含む反応液に GAP2 を加えた時に、元々 PHB 上に存在する GAP1 及び添加した PHB 分解酵素がどのような挙動を示すかを調べた。GAP2 を加えると GAP1 は PHB 封入体上から外れる事が分かった。また、PHB 分解酵素は GAP2 を加えない場合には PHB 封入体上に結合しているが GAP2 を添加した後では結合を阻害されるという事がわかった。表面上を PHB 結合蛋白質で覆われていない人工 PHB 顆粒を基質とした場合には GAP2 による活性促進作用は見られなかった。以上の結果から GAP2 による活性促進作用は PHB 分解酵素に作用して起こるのではなく、GAP2 によって native PHB の構造変化を引き起こされて分解されやすくなるのではないかと考えられる。

GAP1 および GAP2 の大量発現株は野生株と比較すると PHB を蓄積している状態では細胞内の PHB 含有率に大きな変化はなかった。蓄積した PHB を分解する条件で培養すると GAP1 大量発現株では野生株と違いが見られなかったが、GAP2 大量発現株では野生株よりも分解速度が遅く、最終的に細胞内に残った PHB の含有率も高かった。

native PHB を基質とした試験管内での活性促進作用とは反対の阻害的な効果が細胞内では見られた。

GAP1、2 大量発現株における PHB 蓄積時の PHB の形態は PhaP を大量発現させたときと同様に多数の小さな顆粒状になっていた。以上の結果から *R. metallidurans* において GAP1 は PhaP に相当するものであると考えられる。GAP2 は PhaP と同様の機能も持っていると考えられるが、発現量の少なから考えると PhaP として働いているのではないと考えられる。また、GAP2 による活性促進作用が細胞内で起こっている可能性は少なく GAP2 が常に発現しており、大量発現株では PHB 分解時に阻害的に働く事を考えると GAP2 の細胞内での役割は PHB 分解時に誘導される PHB 分解酵素の発現量の調節を行っているのではないかと予測される。

## 謝辞

この研究は 2005 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究「環境にやさしい有機材料設計のための劣化の制御に関する研究」(代表者: 大石不二夫) の研究の一環として研究助成を受けて行われました。お礼申し上げます。

## 文献

- 1) Merrick JM and Doudroff M (1964) Depolymerization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.* 88: 60-71.
- 2) Handrick R, Technow U, Reichart T, Reinhardt S, Sander T and Jendrossek D (2004) The activator of the *Rhodospirillum rubrum* PHB depolymerase is a polypeptide that is extremely resistant to high temperature (121 degree C) and other physical or chemical stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* 230: 265-274.
- 3) Handrick R, Reinhardt S, Schultheiss D, Reichart T, Schuler D and Jendrossek D (2004) Unraveling the function of the *Rhodospirillum rubrum* activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation: the Activator is a PHB-granule-bound protein (phasin). *J. Bacteriol.* 186: 2466-2475.