

畑より単離した*Pseudomonas* sp. KF10 のポリ-3-ヒドロキシ酪酸分解酵素とポリ-3-ヒドロキシオクタン酸分解酵素の精製とその性質

神奈川県理学部 白木麻里、菅谷理恵、八島工、山下由佳、斎藤光実

**[目的]** PHB (ポリ-3-ヒドロキシ酪酸) が生分解性プラスチックとして注目されている中で、現在多くのPHB分解菌が単離されその分解酵素が研究されている。またPHBのみならず他のポリヒドロキシアリカンエイト (PHA) についても同様の研究がなされている。PHO (ポリ-3-ヒドロキシオクタン酸) は *Pseudomonas oleovorans* が菌体内に蓄積する生分解性ポリエステルである。我々は神奈川県理学部畑よりPHBだけではなくPHOも分解する微生物 *Pseudomonas* sp. KF10を単離して細胞外のPHB分解酵素とPHO分解酵素を精製しその性質の検討を行った。

**[方法]** *Pseudomonas* sp. KF10の単離—神奈川県理学部畑より採取した土壌約5gを10mlの水道水に懸濁し、その上清を炭素源としてPHOのみを含む培地にて3-10日間30°Cにて培養した。培養液の上清を $10^3$ - $10^{10}$ に希釈して炭素源としてPHOのみを含む寒天培地に加えた後2-7日間インキュベートした。クリアゾーンを形成したコロニーを取り、再び液体培地にて1日培養し、希釈してPHOプレートにまき、最終的にはクリアゾーンを作らないコロニーがなくなるまでこの操作を繰り返して、菌を単離した。単離した菌をPHBのみを炭素源として含む寒天培地にて培養したところ、同じようにクリアゾーンを形成したため、単離した菌はPHO斜面培地、PHB斜面培地と凍結(-20°C)にて保存した。

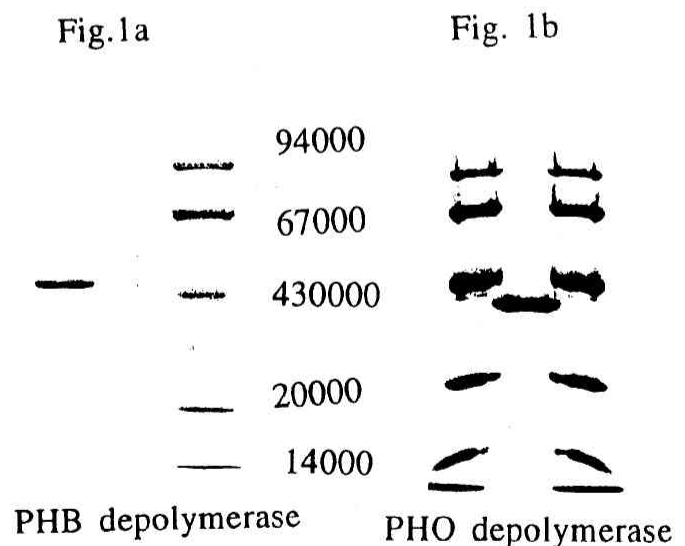
**細胞外PHB分解酵素の精製**—KF10をPHBのみを炭素源とする培地に疎水性吸着体ブチルトヨパールを添加して30°Cにて培養した。2日後ブチルトヨパールを回収してカラムに詰めて20%エタノールを含むバッファーで洗浄した後、40%エタノールを含むバッファーで溶出した。透析、濃縮の後TEAEセルロースにチャージして0-0.4M NaClの濃度勾配によって溶出した。透析濃縮して精製酵素とした。

**細胞外PHO分解酵素の精製**—KF10をPHOのみを炭素源とする培地で2日間にて培養した後培養液の上清を濃縮透析してTEAEセルロースにチャージして0-0.5M NaClの濃度勾配によって溶出した。透析濃縮して精製酵素とした。

**阻害剤の影響**—DFP, PMSF, DTTの影響について調べた。

**[結果]** 精製酵素はPHB分解酵素、PHO分解酵素ともに電気泳動的に単一であり、分子量は電気泳動よりそれぞれ約46000、37000 Daであった(Fig.1 a,b)。また至適pHは両酵素ともにほぼ8.5であった(Fig.2)。阻害剤の影響については Fig.3に示した。

活性セリンの阻害剤であるDFP (diisopropyl fluorophosphate)はPHB分解酵素を0.02mMでほぼ100%阻害したがPHO分解酵素は1mMでも活性40%程度しか阻害しなかった。一方セリンプロテアーゼの阻害剤であるPMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)ではPHO分解酵素のほうがPHB分解酵素より影響を受けた。またS-S結合を開裂するDTT (ジチオスレイトール) を作用させると両方の酵素ともほぼ同じくらい影響を受けた。これらの結果より両酵素共今まで研究されているほかのPHB分解酵素と同じく、S-S結合とセリン残基が分解活性に関与していると推測される。



Purification and Properties of Extracellular Poly-3-hydroxybutyrate Depolymerase and Poly-3-hydroxyoctanoic acid depolymerase from *Pseudomonas* sp. KF10 isolated from the field of Kanagawa University.

Mari Shiraki, Rie Sugaya, Takumi Yashima, Yuka Yamashita and Terumi Saito

Department of Biology, Faculty of Science, Kanagawa University, 2946 Tsuchiya, Hiratsuka, Kanagawa, 259-12

TEL 0463-59-4111 FAX 0463-59-2361

抗体反応の結果はTable 1. に示した。この結果よりKF10のPHB分解酵素は以前当研究室で単離された *Pseudomonas* sp. S2のPHB分解酵素の抗体と良く反応することがわかった。

[考察] *Pseudomonas* sp. KF10はPHB,PHOの両方を利用して成長できる菌であり、細胞外にPHB分解酵素とPHO分解酵素を分泌している。両酵素の最適pHなどは良く似ているが阻害剤の影響については大きく異なる。また、両酵素がどのように調節されて分泌されているかはまだ不明であり、今後の課題である。

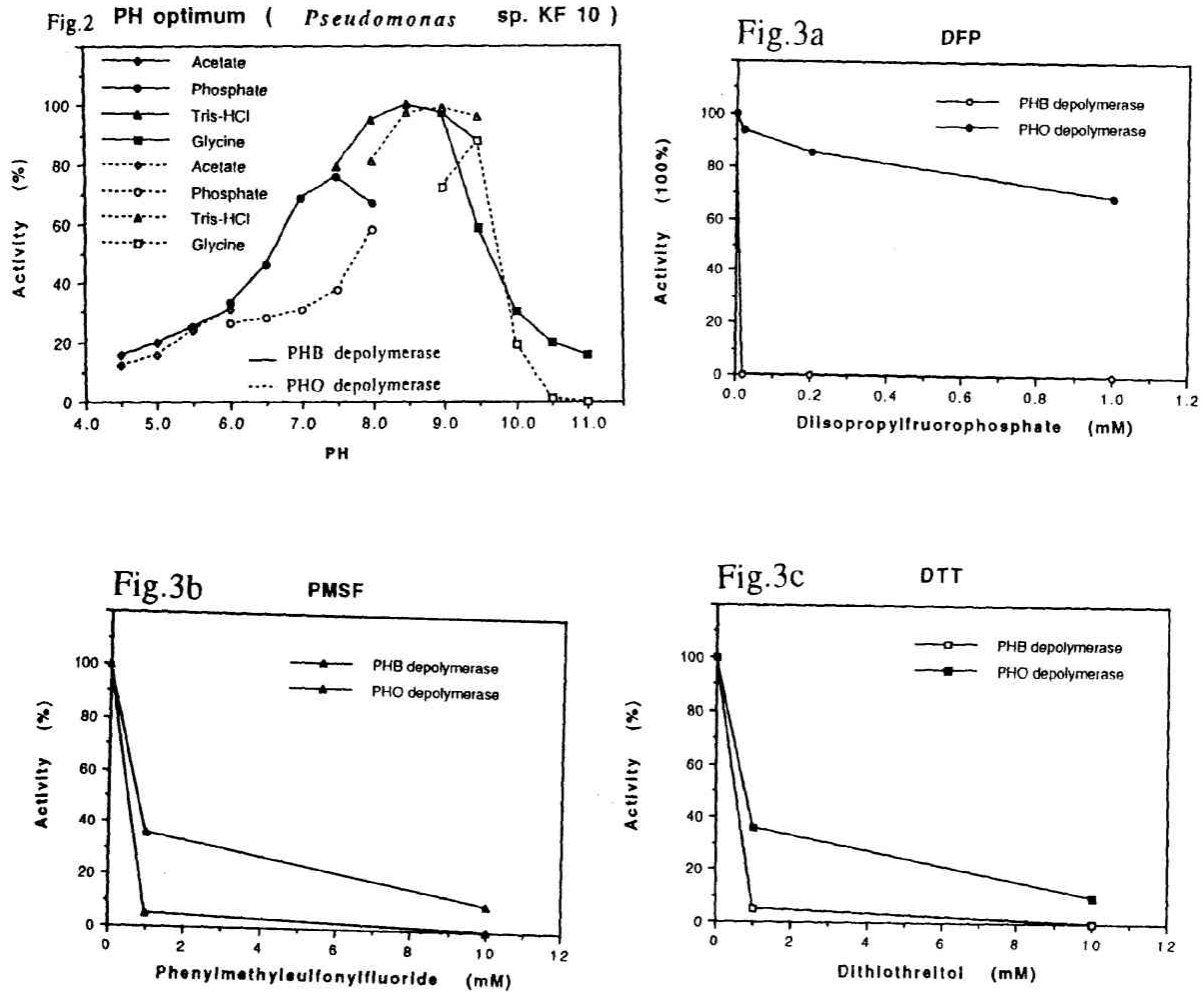


Table 1. Crossreactivity

| Enzymes                                | Antibody                      |                                     |                               |  |
|--|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--|
|  | P. sp. A1<br>PHB depolymerase | P. sp. A1<br>3HB oligomer hydrolase | P. sp. S2<br>PHB depolymerase | <i>A. faecalis</i><br>PHB depolymerase |
| P. sp. A1<br>3HB oligomer hydrolase    | ++                            | ++                                  | ++                            | +                                      |
| P. sp. S2<br>PHB depolymerase          | +                             | +                                   | ++                            | ND                                     |
| <i>A. faecalis</i><br>PHB depolymerase | ++                            | +                                   | ND                            | ++                                     |
| P. sp. KF10<br>PHB depolymerase        | ND                            | ND                                  | ++                            | ND                                     |

ND: not determined