

ポリプロピオラクトン分解酵素の精製とその遺伝子のクローニング

小林 照幸・斉藤光実 (神奈川大・理・応用生物)

環境中で分解されるプラスチックとして生分解性ポリエステルが知られている。生分解性ポリエステルには種々の細菌が細胞内に炭素／エネルギー源として貯蔵するポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) やポリ-3-ヒドロキシオクタン酸 (PHO)、また石油を原料とする脂肪族ポリエステルのポリカプロラクトン (PCL) やピオノーレなどがあり、これらのポリエステルは環境中に存在する細菌により分解される。PHB や PHO の分解酵素 (デポリメラーゼ) は細胞内、外から見つかり、PCL などの直鎖脂肪族ポリエステルはリパーゼによって分解されることが分かっている。

われわれは PHBデポリメラーゼ、リパーゼの両方によって分解される生分解性ポリエステルであるポリプロピオラクトン (PPL) について分解酵素の精製とその遺伝子のクローニングを行った。

最初に PPL 分解菌の単離を行った。まず PPL を唯一の炭素源とした最少塩類液体培地を作り、これに池や川、土の懸濁液の上清を加え約 1 週間培養後、同じ組成の寒天培地に培養液を希釈してまきクリアゾーンを形成する菌を単離した。約 15 種類単離した中で培養上清に PPL 分解活性が最も強く見られる菌の 1 つである KSP1 について PPL デポリメラーゼの精製を行った。

PPL デポリメラーゼは培養液の遠心上清を透析後、CM-Toyopearl、mono-Q、mono-S のカラムを使って精製した。この精製酵素は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 上で単一のバンドを形成し分子量が約 50,000 であることが分かった。また最適 pH は 8.5 であり N 末端のアミノ酸配列は A-V-N-L-P-A-L-K-I-D-K-T-Q-T-T-V-S-G-L-S-G であった。

次にこの酵素の遺伝子のクローニングを行った。KSP1 から染色体 DNA を精製し制限酵素 *Sau3A*I を用いて部分消化した。この約 2 ~ 6 Kbp の DNA 断片をクローニングベクター pUC19 のマルチクローニングサイト上にある *Bam*HI サイトに挿入した。このプラスミドを用いて形質転換した大腸菌 JM109 を PPL を含んだ寒天培地上にまき 30 °C で 2 ~ 7 日間インキュベートした。この方法でクリアゾーンを形成するコロニーが見つかり、その大腸菌のプラスミドに約 4 Kbp の DNA 断片が挿入されていることが分かっ

た。さらにサブクローニングを行い約 2 Kbp の DNA 断片中に PPL デポリメラーゼの構造遺伝子が含まれていることが分かり、その部分の塩基配列決定を行った。その結果、KSP1 の培養上清から精製された酵素の N 末端のアミノ酸配列と同じ配列に相当する塩基配列が見つかった。この配列を含んだオープンリーディングフレーム (ORF) による蛋白質の分子量は 48,575 であった。

形質転換した大腸菌 JM109 から得られた精製酵素の分子量は約 50,000 であった。SDS-PAGE 上におけるエステラーゼ反応、イムノブロットングによる抗体反応においても同一分子量のバンドが見られた。これらの結果により今回クローニングされた遺伝子は KSP1 の PPL デポリメラーゼであることを確認した。

今回精製された KSP1 の PPL デポリメラーゼについて性質を調べ私達の研究室で今までに精製された PHB デポリメラーゼと比較した。まずこの酵素の PHB 分解活性について調べたところ既知の PHB デポリメラーゼとほぼ同じ程度の分解活性が見られた。一方リパーゼ活性はほとんどなかった。また見ついている全ての PHB デポリメラーゼが阻害を受ける活性セリンの修飾剤ジイソプロピルフルオロフォスフェイトによってこの酵素も阻害を受けた。次に PHB デポリメラーゼ数種類について界面活性剤の影響を調べたところ強く阻害されるものと阻害の程度の低いものの 2 種類に分けることができた。PPL デポリメラーゼについても同様に調べたところあまり阻害されないものに属することが分かった。これらのことより今回精製された PPL デポリメラーゼは PHB デポリメラーゼの一種であることが分かった。

今後は活性中心と思われるセリンの部位特異的変異による活性の変化ならびに最初にクローニングされた 4 Kbp の DNA 断片中に含まれる PPL デポリメラーゼの構造遺伝子の後続く ORF の塩基配列決定を行う予定である。