

E-2. *Ralstonia eutropha* H16 の細胞内 PHB depolymerase の性質に関する研究神奈川大 総合理学研究所¹・理² 小林 照幸¹・杉山 明典²・齊藤 光實²

[緒言]

ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) は種々の微生物が細胞内にエネルギー源として貯え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。細菌が細胞外に分泌する PHB depolymerase については、精製ならびに遺伝子のクローニングがなされ、その性質が調べられてきた。一方、細胞内 PHB depolymerase に関しては、細胞内での PHB 代謝に重要な役割を果たしていると考えられているにも関わらず、その研究はあまり進んでいない。

我々はこれまでに *Ralstonia eutropha* H16 の細胞内 PHB depolymerase の大腸菌での発現と精製を行ないその性質を調べた。また、site directed mutagenesis により 183 番目のシステインをセリンもしくはアラニンに置換した変異型の酵素を作成し性質を調べた。その結果アラニンに置換した酵素には PHB depolymerase 活性がなく、183 番目のシステインが活性中心のアミノ酸であることが示唆された。

今回、これら *R. eutropha* H16 の細胞内 PHB depolymerase の変異型の性質を検討し、さらに野生型の酵素についてもその性質に関して詳細な検討を行った。

[実験]

R. eutropha H16 の細胞内 PHB depolymerase は野生型、変異型、共に酵素の C 末端に His tag を付加し pET system を用いて大量発現を行なった。発現した PHB depolymerase はコバルトカラムを使って精製した。結晶化 PHB グラニュール、人工アモルファス PHB グラニュール、直鎖 3-ヒドロキシ酪酸 (3HB)オリゴマー、環状 3HB オリゴマーを基質として使用し、野生型、変異型の基質特異性を調べた。PHB もしくは 3HB オリゴマー分解活性は分解により放出される 3HB を 3HB デヒドロゲナーゼを用いて酵素的に定量することで測定した。PHB グラニュールを基質として使用したときの活性は反応後に 3HB オリゴマーハイドロラーゼで処理し、反応液中の 3HB オリゴマーを完全にモノマーに分解したもの、反応液中に 3HB オリゴマーハイドロラーゼを加えたものについて測定した。また、野生型、変異型の酵素の阻害剤による影響を調べた。

野生型の酵素については人工アモルファス PHB グラニュールを基質として使用したときの分解産物を HPLC を用いて調べた。

[結果と考察]

前に述べたように *R. eutropha* の細胞内 PHB depolymerase は 183 番目のシステインをアラニンに置換すると活性を失う。また、*R. eutropha* の細胞内 PHB デポリメラーゼと BLAST search で見つかった細胞内 PHB depolymerase であると考えられる蛋白質には、細胞外 PHB depolymerase の活性中心に共通して見られるリパーゼボックス (-G-X-S-X-G-) がなく、共通したセリンも存在しなかった。このことから 183 番目のシステインが活性中心のアミノ酸であると考えられる。しかし、183 番目のシステインをセリンに置換した酵素 (C183S) は 人工アモルファス PHB グラニュールを分解した。

C183S は人工アモルファス PHB グラニュール以外にも 3HB trimer を分解したが、3HB dimer、結晶化 PHB グラニュールは分解しなかった。この基質特異性は野生型と同じであるが、どの基質を使用した場合においても野生型に比べて C183S の方が高い活性を示した。

阻害剤の影響を調べたところ SH 基の修飾剤である PCMB では両酵素とも阻害された。また、活性中心のセリンの修飾剤である DFP による影響を調べると、野生型では 1mM で阻害されなかったが C183S は阻害されるようになった。この結果からも *R. eutropha* の細胞内 PHB depolymerase の活性中心は 183 番目のシステインであることが示唆された。

野生型の酵素については環状 3HB trimer、環状 3HB pentamer、直鎖 3HB pentamer を基質として活性を測定した。環状 3HB trimer は分解しなかったが 3HB pentamer は環状、直鎖とも同程度分解した。3HB オリゴマーの分解活性については *Ralstonia pickettii* T1 の細胞外 PHB depolymerase と似た性質を示すことが分かった。

人工アモルファス PHB グラニュールを基質として使用しその分解産物を調べた。その結果、大部分が 3HB dimer でありそれ以外にも少量のオリゴマーとモノマーが存在していた。また、人工アモルファス PHB グラニュールを基質として用い、反応液中にオリゴマーハイドロラーゼを加えて活性を測定すると、反応終了後に遠心し、その上清にオリゴマーハイドロラーゼを加えて測定したときよりも高い活性を示した。*R. eutropha* の細胞内オリゴマーハイドロラーゼは細胞内の PHB グラニュール上と細胞質中に存在する。これらの結果から細胞内における PHB グラニュールの分解がオリゴマーハイドロラーゼの存在下でより促進されるということを示唆している。また、分解産物の大部分が 3HB dimer であることと、3HB オリゴマーに対する基質特異性が細胞外 PHB depolymerase と似ていることから、その分解様式はエンド型であると予想される。