

M-3 細胞内ポリエステルの生分解

神奈川大学理学部

齊藤光實・小林照幸

細菌の産生するポリエステル、poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)の細胞内生分解については不明な点が多い。そこで ① *Ralstonia eutropha* における細胞内3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolaseの性質、並びに② *R. eutropha*における新規の細胞内PHB分解酵素探索を行った。

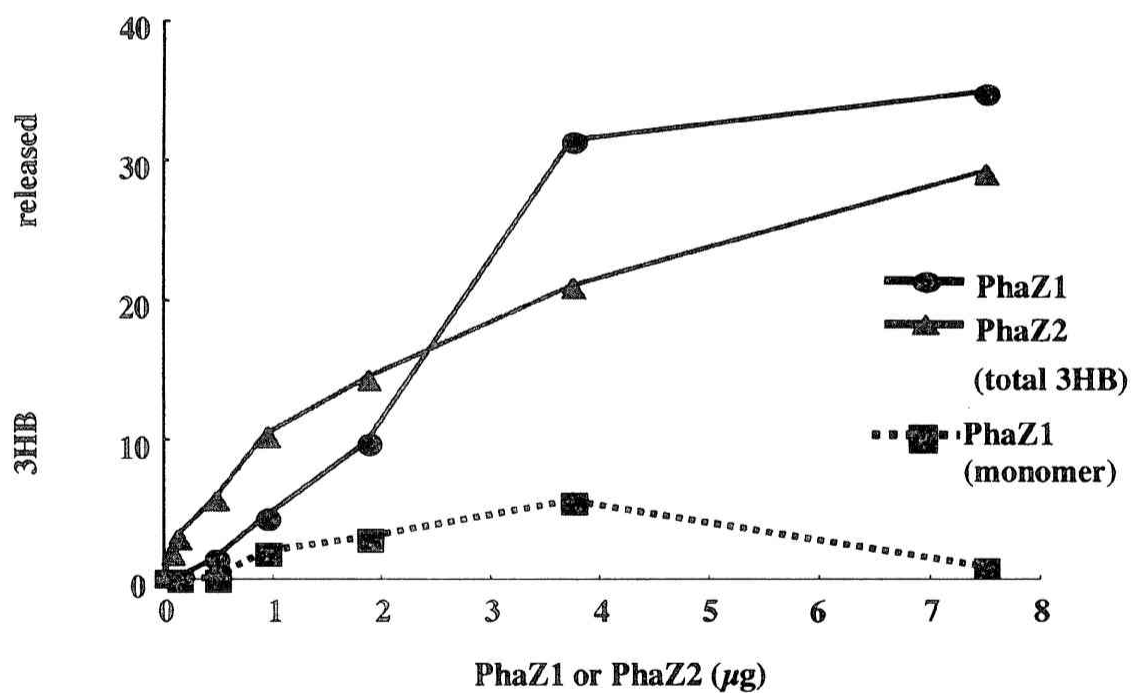
1. 研究成果

① *R. eutropha* における細胞内3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2)の遺伝子は既にこのプロジェクトでクローニングされている。今回この酵素の遺伝子を含む大腸菌から活性のある酵素を電気泳動的に均一にまで精製し、その性質を詳細に検討した (Table 1)。その結果、PhaZ2は最初に発見された細胞内PHB分解酵素(PhaZ1)と同じ程度にアモルファスPHBを分解することが分かった。PhaZ1 を使用してアモルファスPHBを分解するとその大部分がオリゴマーであるのに対して PhaZ2 を使用した場合には3HBモノマーしか放出しなかった (Fig. 1)。このことからPhaZ1はエンド型の酵素でありPhaZ2はエキソ型の酵素であると考えられる。しかし、PhaZ2は環状3HB-oligomerを分解することからエンド型、エキソ型両方の活性を持っているが通常はエキソ型として働いていると考えられる。また、アモルファスPHBを分解するときにPhaZ1とPhaZ2を特定の割合で反応液中加入すると3HBモノマーの放出量はそれぞれ単独で加えた場合よりも増加した (Fig. 2)。PhaZ1とPhaZ2の細胞内局在性を調べた結果、PhaZ1はPHB inclusion body上にだけ存在したのに対し、PhaZ2はPHB inclusion bodyと細胞質の両方に存在していた。*phaZ1*欠損株と*phaZ2*欠損株ならびに両遺伝子を共に欠く欠損株を作製し、色々な条件でのPHBの蓄積量を野生株と比べることにより、これら2つの酵素の役割を考察した。*PhaZ1*欠損株(D1)と*phaZ2*欠損株(OH1)はsuicide vector pJP5603 (カナマイシン耐性)を用いて作製した。*phaZ1*と*phaZ2*両方の欠損株はDr. Jendrossekより入手した*R. eutropha phaZ1*欠損株H16-SK1544とHF210-SK1542を用いてOH1-H16-SK1544とOH1-HF210-SK1542を得た。4種の*R. eutropha*を400 mlの完全培地にフラクトースを2%加えて培養し、各時間に集菌し菌体内のPHB量をガスクロマトグラフィーにより定量した。乾燥菌体重量当たりのPHB蓄積量の経過変化をFig. 3に示した。全ての株でPHBの蓄積量は培養を開始した後、対数増殖期で増加し定常期前期においては減少した。野生株では培養後約50時間でPHB蓄積量は大きく減少したがPhaZ1 mutant とPhaZ2 mutantではその減少は緩和された。PhaZ1とPhaZ2の両方を欠くdouble mutantでは、さらにその減少幅は小さくなったが、全く減少が抑えられた訳では無かった。このことよりPhaZ1とPhaZ2以外にさらに別の細胞内分解酵素が存在する可能性が示された。

TABLE 1. Purification of PhaZ2 from *E. coli* harboring *phaZ2*_{Reu}^a

Step	Amt of protein (mg)	Activity (units)	Sp act (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	500	1400	2.7	(100)
DEAE-Toyopearl	28	1100	38	78
Butyl-Toyopearl	14	520	38	38
Phenyl-Sepharose HP	2.7	180	67	13

^aEnzyme was purified from a 0.5-liter culture.



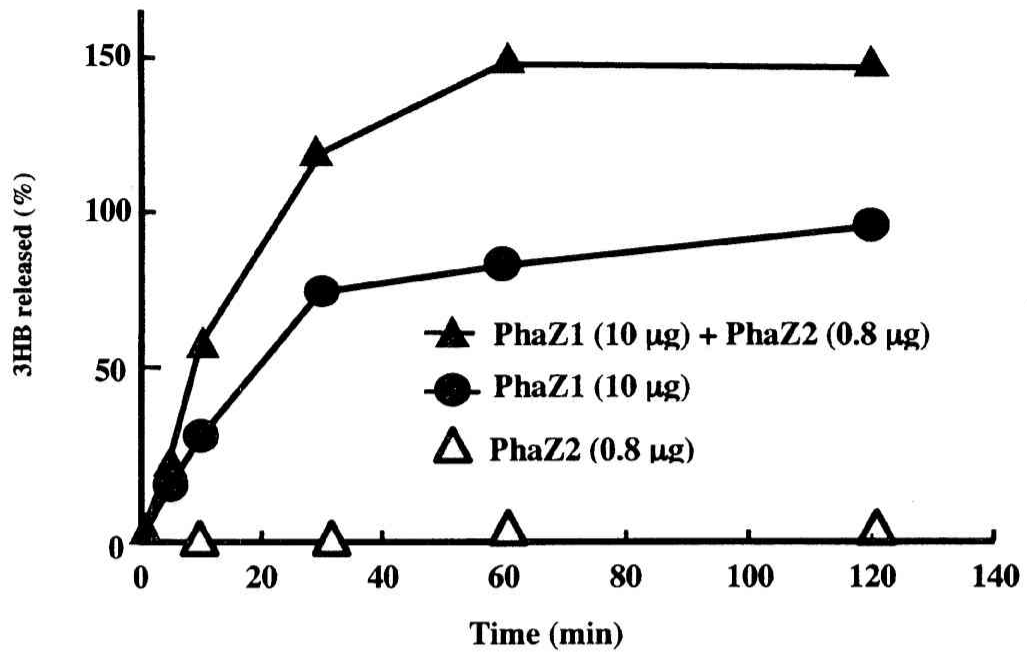
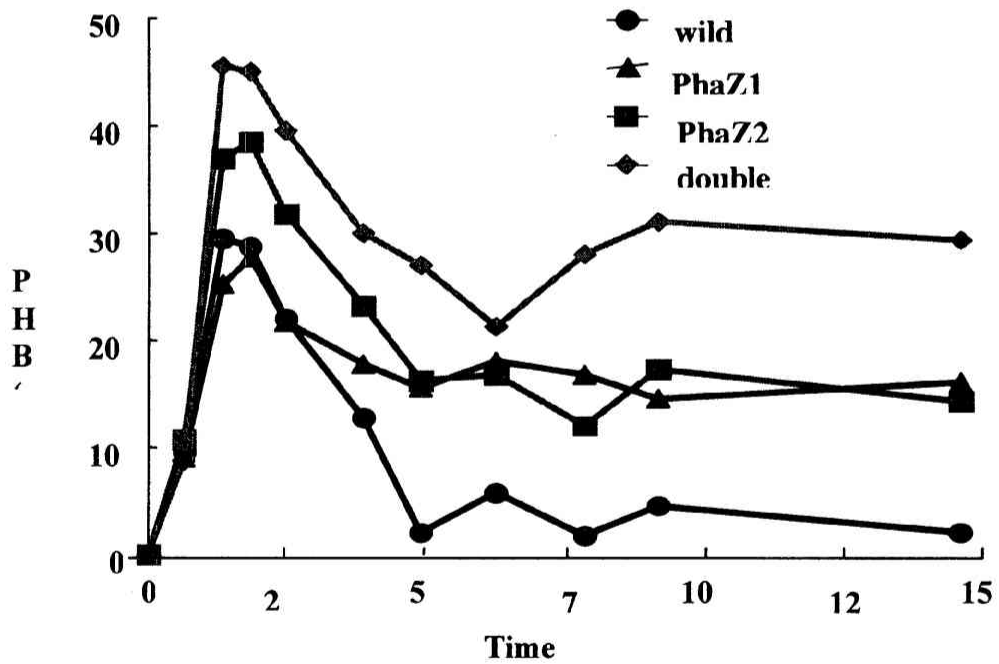


Fig. 3.



② *R. eutropha*における新規の細胞内PHB分解酵素探索—既にPhaZ1、PhaZ2の2種類の性質の異なる酵素が見つかった。しかし、それらの遺伝子の欠損株では、いまだPHBの分解が見られる。この結果は既に見つかった酵素以外にもPHB

分解酵素が存在するということを示していると考えられる。*Acidovorax* sp. strain SA1の細胞内3HB oligomer hydrolase,のアミノ酸配列をもとにホモロジー検索を行ったところ*Ralstonia metalidurance (eutropha)*、*Ralstonia solanacearum*に類似性の高い蛋白質が見つかった。

2. 平成14年度成果発表

(原著)

- S. Miyazaki, K. Takahashi, M. Shiraki, T. Saito, Y. Tezuka, and K. Kasuya. Properties of a poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *penicillium funiculosum*: J. Polym. Environment. 8, 175-82 (2000) (2002)
- A. Sugiyama, M. Shiraki, T. Kobayashi, G. Morikawa, M. Yamamoto, M. Yamaoka, and T. Saito. Cloning and sequencing of an intracellular D(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase from *Acidovorax* sp. strain SA1 and purification of the enzyme: Current Microbiol. 45, 123-127 (2002)
- H. Saegusa, M. Shiraki, and T. Saito. Cloning of an intracellular D(-)-3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and identification of the active site serine residue by site-directed mutagenesis: J. Biosci. Bioeng. 106, 106-112 (2002) (口頭発表)
- 小林、白木、齊藤： *Ralstonia eutropha* H16におけるポリ-3-ヒドロキシ酪酸の分解；第51回高分子討論会（2002, 10月、福岡）
- 杉山、小林、白木、齊藤：ポリ（3-ヒドロキシ酪酸）とその関連化合物に働く加水分解酵素の役割；第51回高分子討論会（2002, 10月、福岡）
- T. Saito, T. Kobayashi, A. Sugiyama, and M. Shiraki: Intracellular PHB degradation in *Ralstonia eutropha*; International Symposium on Biological Polyesters 2002 (2002, Sep., Germany)
- T. Kobayashi, A. Sugiyama, and T. Saito: Characterization of an intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Ralstonia eutropha* H16; International Symposium on Biological Polyesters 2002 (2002, Sep., Germany)
- A. Sugiyama, T. Kobayashi, and T. Saito: The role of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase and 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in poly(3-hydroxybutyrate) metabolism; International Symposium on Biological Polyesters 2002 (2002, Sep., Germany)