

光合成細菌の細胞内 poly(3-hydroxybutyrate) 分解酵素

神奈川大学理学部 小林照幸

神奈川大学理学部 松本 篤

神奈川大学理学部 安部智子

神奈川大学理学部 齊藤光實

1. 緒言

ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) は種々の細菌が細胞内に炭素/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 から 2 種類の細胞内 PHB depolymerase 遺伝子のクローニングを行った (PhaZ1、PhaZ2)。また、大腸菌での発現と精製を行ない、その性質を調べた。PhaZ1 のアミノ酸配列はわずかに PHB synthase と類似性が見られたが、それ以外には似た配列を持つ蛋白質は見つからなかった。PhaZ2 は *Ralstonia piketti* T1 の細胞外の 3-ヒドロキシ酪酸 (3HB)-oligomer hydrolase と類似したアミノ酸配列を持ち、その性質も非常に似ていた。¹⁾

光合成細菌である *R. sphaeroides* と *R. rubrum* は嫌氣的条件下で光をあると細胞内に PHB を蓄積する事が知られている。*R. rubrum* については以前から細胞内可溶性画分に存在する PHB depolymerase と 3HB-oligomer hydrolase の存在が知られており、最近になって PHB depolymerase の精製とクローニングがなされた。²⁾ この 2 種類の光合成細菌はゲノムの遺伝子配列の解析が進行中である。

今回、*R. sphaeroides* と *R. rubrum* から細胞内で PHB 分解に関与している蛋白質の遺伝子をクローニングし、大腸菌での発現と遺伝子産物である PHB depolymerase ならびに 3HB-oligomer hydrolase の性質を調べた。

2. 実験

R. eutropha H16 の PhaZ1、PhaZ2、あるいは細胞外に PHB depolymerase を分泌し、細胞内に 3HB-oligomer hydrolase を持つ細菌である *Acidovorax* sp. SA1 の 3HB-oligomer hydrolase のアミノ酸配列を元に BLAST search を行った。これらの蛋白質のうち *R. sphaeroides* と *R. rubrum* において類似性が認められた蛋白質の遺伝子の塩基配列からプライマーを作成し、PCR により遺伝子のクローニングを行なった。クローニングした遺伝子は pET vector に繋いだ後、大腸菌で発現させ、大腸菌の粗抽出液に含まれる遺伝子産物の酵素活性を測定した。酵素活性は人工アモルファス PHB グラニュール、3HB-

oligomerを基質として使用し、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rol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後に 3HB 量を測定した。

3. 結果と考察

BLAST search結果、*R. sphaeroides* と *R. rubrum*の既に決定されている遺伝子配列中には *R. eutropha* の PhaZ1 と類似性の高いアミノ酸配列を持つ蛋白質は見つかったが、PhaZ2 に似た配列は見つからなかった。*Acidovorax* sp. SA1 の細胞内 3HB-oligomer hydrolase と類似性のあるアミノ酸配列を持つ蛋白質 (PhaZ3) は両細菌から見つかった (Table 1)。

Table 1 Existence of similar proteins to PHB depolymerase and 3HB-oligomer hydrolase

Enzymes	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>R. eutropha</i> H16		
PhaZ1	+	+
PhaZ2	-	-
<i>Acidovorax</i> sp. SA1		
3HB-oligomer hydrolase	+	+

両細菌の *phaZ1*、*phaZ3* の遺伝子配列を元に PCR を行った結果、予想される大きさの DNA 断片が増幅された。これらの DNA 断片を pET vector に繋いでプラスミドを作成し、大腸菌 BLR(DE3)pLysSを形質転換した。IPTG による発現誘導後の大腸菌の粗抽出液中にPhaZ1、PhaZ3が認められた。これらの粗抽出液を使って基質特異性を調べた (Table 2)。

Table 2 Substrate specificity of the PhaZ1 and PhaZ3 from photosynthetic bacterium

Enzymes	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
PhaZ1	Artificial amorphous PHB granules 3HB-tetramer, pentamer	Artificial amorphous PHB granules 3HB-tetramer, pentamer
PhaZ3	3HB-dimer, trimer, tetramer, pentamer	3HB-dimer, trimer, tetramer, pentamer

その結果、*R. sphaeroides* と *R. rubrum* のどちらの PhaZ1 も *R. eutropha* の PhaZ1 と同様の基質特異性を示した。PhaZ3 は 3HB-oligomer のみを分解し、人工アモルファス PHB グラニュールは分解しなかった。*R. eutropha* の PhaZ2 は 3HB-oligomer を非常に効率良く分解するが同時に PHB も分解する事が報告されている。³⁾ 今回調べた 2 種類の光合成細菌は、PhaZ2 を持たない代わりに 3HB-oligomer のみを分解する PhaZ3 を持っていた。この点は *R. eutropha* の細胞内での PHB 分解系とは異なる。また、*Acidovorax* sp. SA1 の細胞内 3HB-oligomer hydrolase は 3HB-dimer, trimer のみを分解するのに対して、

PhaZ3 は広い基質特異性を持っていた。この性質は *R. eutropha* の PhaZ2 と類似した性質であると考えられる。*R. rubrum* からは今回クローニングした酵素とは異なる PHB depolymerase が精製、クローニングされているが²⁾、未だ細胞内のPHB分解系には不明な点が多い。今後、これらの酵素の精製を行い、これらの酵素の細胞内局在性、発現の時期等に加えてさらに詳細な性質の検討を行う予定である。

1) H. Saegusa et al., J. Bacteriol., 183, 94 (2001); H. Saegusa et al., J. Biosci. Bioeng., 94, 106 (2002)

2) D. Jendrossek et al., Ann. Rev. Microbiol., 56, 403 (2002)

3) T. Kobayashi et al., J. Bacteriol., 185, 3485 (2003)