

2B11-3 D-3-hydroxybutyrate (3HB) の発酵生産

○白木 麻里¹, 遠藤 隆一², 齊藤 光實¹
(¹神奈川大・理・生物,²三菱レーヨン横浜技術研)

【目的】Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) は種々の細菌が菌体内に蓄積するポリエステルである。PHBを構成する3-hydroxybutyrate (3HB)は色々な生物内で重要な役割を持つ物質であり、一方工業的には医薬品などの原料として用いられている。ここでは *Ralstonia eutropha* の 3HB dehydrogenase (3HBDH) 遺伝子を破壊した欠損株、又は組み換え菌を使用して、3HBの発酵生産を行った。

【方法】PHB合成系遺伝子 (phaCAB, *R. eutropha*由来) をハイコピークローニングベクター pUC19 (Ampicillin 耐性) に、PHB分解系遺伝子 (phaZ7, *Paucimonas lemoignei* 由来) をローコピークローニングベクター pSTV29 (Chloramphenicol 耐性) に挿入し、抗生物質耐性により両方を同時に保持する大腸菌を選択した。この大腸菌を培養して、培養上清中の3HB濃度を経時的に測定した。*P. lemoignei* 由来のPHB分解酵素による PHB の分解産物は3HBオリゴマーが80%以上であるため、測定には3HBオリゴマー分解酵素を加えて行った。培養はLB培地を用いて37° Cで行いO.D. (600 nm) が0.4の時IPTG (0.1 mM) と糖を加えてさらに培養を続けた。培地中に放出される3HB、及び3HBオリゴマーの濃度は上昇し、約4日目で最大に達した。これまで試みた条件のうち、最高濃度を示したものはグルコースを2%加えた場合で、生産量は3HB換算で70 mMであった。グルコース2%溶液は110 mMに相当するので、培地に加えたグルコースの約70%が3HB、及び3HBオリゴマーとして細胞外に分泌生産されたこととなる。

Fermentative production of D-3-hydroxybutyrate (3HB)

○Mari SHIRAKI¹, Ryuichi ENDO², Terumi SAITO¹
(¹Dept. Biol. Sci., Kanagawa Univ., ²Mitsubishi Rayon Yokohama Tech. Lab.)

Key words D-3-hydroxybutyrate, PHB, PHB depolymerase, *Ralstonia eutropha*

2B11-5 酵素進化化学による *Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PHA 重合酵素に PHA 共重合ポリエステルの組成制御

○青木 絵美¹, 高瀬 和真², 松本謙一郎², 土肥 義治³, 田口 精一^{1,2}
(¹北大院工・分子化学,²理研・高分子化学,³東工大院・総合理工)

【目的】*Pseudomonas* 属細菌は中長鎖(炭素数6から14)の3-ヒドロキシアルカン酸(3HA)をモノマーユニットとしたPHAを合成するタイプIIPHA重合酵素に位置づけられている。その中で*Pseudomonas* sp. 61-3由来のPHA重合酵素(PhaC1_{P6})は他のタイプIIのPHA重合酵素と異なり、炭素数4の3-ヒドロキシブタン酸(3HB)をモノマーユニットとして取り込む能力がある。この能力がある。この能力をさらに増強することによって、多様な3HBベースの共重合ポリエステルを創製することを目的とした。

【方法および結果】PhaC1_{P6}の進化化学的手法により、大腸菌において3HBモノマーユニットの取り込みを促進する優良変異が新たに1つ見い出された。そこで、触媒活性残基の近傍に位置する当該サイトに総アミノ酸置換を施し、変異酵素の *in vivo*, *in vitro* 分析を行った。また、他の推定優良変異点との掛け合わせ、PhaC1_{P6}の立体構造のモデリングを行い、変異酵素を考察した。

Composition control of PHA copolymer by molecular evolutionary engineering of *Pseudomonas* sp. 61-3 PHA synthase

○Emi AOKI¹, Kazuma TAKASE², Ken'ichiro MATSUMOTO², Yoshiharu DOI³, Seiichi TAGUCHI^{1,2}
(¹Dept. Eng. Molecular Chemistry, Hokkaido Univ., ²Polymer Chem, Lab., RIKEN, ³Dept. Innov. Eng. Materials, Tokyo Inst. Technol.)

Key words *Pseudomonas* sp. 61-3, polyhydroxybutyrate, PHA synthase, substrate specificity

2B11-4 キメラ構築法によるPHA重合酵素の基質特異性変換

高瀬 和真¹, 土肥 義治², 田口 精一³
(¹理研・高分子,²東工大院・総理工,³北大院・工・分子化学)

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)合成酵素(PhaC)は、その一次配列と基質特性により3つのタイプに分類される。我々はこれまでにランダム変異導入に基づく進化化学によりPhaCの高活性化・モノマー組成比改変に成功している。今回は、キメラ酵素によるPHA合成酵素の機能改変を試みた。*Aeromonas caviae*由来のPhaCは炭素数3から5の短鎖の3-ヒドロキシアルカン酸(3HA)に基質特異性を持つタイプIに分類されるが、炭素数6の3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)もモノマーユニットとして取り込む特徴をもっている。そこで*A. caviae*由来PhaCと同じタイプIに属する*Ralstonia eutropha*由来のPhaCを組み合わせてパートナーに選定し、キメラ人工酵素を構築することを試みた。

【方法および結果】遺伝子間組換えは、PhaCの保存領域、触媒残基、推定2次構造構造を断絶しない4箇所を選び、random multi-recombinant PCR法を用いて行った(計8種)。作製したキメラ酵素遺伝子および各野生型酵素遺伝子を実験に導入し脂肪酸を炭素源としてPHA共重合体蓄積能を調べた。その結果、キメラ酵素のうちN末端側1/3が*A. caviae*由来、残りC末端側2/3が*R. eutropha*由来のPhaCから構成されるキメラ酵素のみが、各野生型酵素よりも高いポリマー蓄積量を示し、そのモノマー組成比も各野生型酵素と異なっていた。わずかではあるが炭素数8のモノマーを含むPHAを蓄積していた。

Substrate specificity alteration of PHA synthase by chimeric recombination

Kazuma TAKASE¹, Yoshiharu DOI², Seiichi TAGUCHI³
(¹Polymer Chem. Lab., RIKEN, ²Dept. Innov. Eng. Mat., Tokyo Inst. Technol., ³Div. Mol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words PHA synthase, *Ralstonia eutropha*, *Aeromonas caviae*, substrate specificity

2B12-1 PHA バイオポリエステル合成調節タンパク質 PhaR の機能解析

○和久田晶子¹, 市村 和義², 前原 晃³, 前田 理久², 田口 精一¹
(¹北大院工,²明大農,³三菱ガス化学)

【目的】微生物生産の環境調和型ポリエステルであるPHAが微生物体内で合成・蓄積される分化メカニズムを解明することは、PHAの生産向上に貢献すると期待される。本研究では、メタノール産化性細菌 *Paracoccus denitrificans* のPHA合成に関与している調節タンパク質PhaRの機能解析に焦点を当てている。PhaRはDNAとPHAポリエステルの両方に結合できるユニークなタンパク質である。そこで、PhaRのDNA結合能に関与するアミノ酸残基を特定することを目的とした。

【方法および結果】error-prone PCR法を用いてPhaRにランダム点変異を導入し、蛍光タンパク質GFPの発光に基づいて確立したインビボアッセイ系により多くの変異体を得た。さらに、可溶性PhaRを発現する変異体についてインビトロ実験を行い、DNA結合能欠失変異体を選択した。また、PHBとの結合実験によってPHB結合能が確認されたので、DNA結合とPHB結合に関与するアミノ酸残基は独立して存在すると考えられる。シークエンスの結果、DNA結合に関与するアミノ酸残基はN末端領域に集中していることがわかった。

Functional analysis of PhaR, Regulate Polyhydroxyalkanoate(PHA) Synthesis

○Akiko WAKUDA¹, Kazuyoshi ICHIMURA², Akira MAEHARA³, Toshihisa MAEDA², Seiichi TAGUCHI¹
(¹Dept. Eng. Molecular Chemistry, Hokkaido Univ., ²Sch. Agric. Meiji Univ., ³Mitsubishi Gas Chemical Co.)

Key words PhaR, DNA binding ability, PHA binding ability, Repressor protein