

2C10-5 PHB バイオポリエステル合成調節タンパク質 PhaR の定量的機能解析

○山田 美和¹, 山下 宏一², 田口 精一¹
(¹北大院・工・生物機能高分子, ²理研・化学分析)

(背景) 生分解性プラスチックであるPHB (polyhydroxybutyrate) は、微生物細胞内で蓄積される際、PHB表面上に大量のphasinタンパク質(PhaP)が結合し、覆うことによって品質管理される。我々は、メタノール資化性細菌*Paracoccus denitrificans*由来の調節タンパク質PhaRに着目している。通常PhaRは、PhaR遺伝子自身およびPhaP遺伝子発現のリプレッサーとして機能しているが、PHBが蓄積され始めると、PHBにPhaRが結合し、遺伝子発現の抑制を解除する。PhaRを介するPHB生合成調節モデルの検証を目的とし、今回、DNA結合はSPR (表面プラズモン共鳴) 解析を、PHB結合はQCM (水晶共振子マイクロバランス) 解析を行ない、PhaRとターゲット分子との相互作用を個別に解析した。(方法・結果) まず、PhaRタンパク質の大量発現・精製系を構築した。DNA との結合は、ターゲットDNAをセンサーチップに固定し、精製PhaRを注入して、SPR解析をした。その結果、解離定数 $=1.82 \times 10^{-7}$ Mと算出され、DNAとの結合性は緩やかであるという特徴がみられた。また、数種のDNA結合能低下変異体でも同様の解析を行なったところ、PhaRのN末端保存領域中のDNA結合に関与するアミノ酸残基の寄与の差異が見出された。次に、PHBとの結合は、水晶共振子上にP(3HB)の溶融結晶化フィルムを作製し、精製PhaRを注入して、QCM解析をした。その結果、PHBに対する吸着は、非常に速く、拡散律速であり、見かけ上不可逆な反応であるということがわかった。

Quantitative functional analysis of a repressor protein (PhaR) related to PHB biosynthesis

○Miwa YAMADA¹, Koichi YAMASHITA², Seiichi TAGUCHI¹
(¹Dept. Eng., Div. Biotech. Macromol. Chem., Hokkaido Univ., ²Chem. Analysis, Lab., RIKEN)

Key words PhaR, DNA binding ability, PHB binding ability

2C11-2 *Wautersia metallidurans* CH34 の poly(3-hydroxybutyrate) 結合蛋白質

○大庭 全洋¹, 小林 照幸², 松崎 智恵子², 齊藤 光寛²
(¹神奈川大院・理・生物, ²神奈川大・理・生物)

【目的】*Wautersia metallidurans* CH34 は、poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) を炭素源、エネルギー源として蓄積、利用している細菌である。*Wautersia eutropha* H16 では5種類のPHB結合蛋白質(PhaP)があるが、*W. metallidurans* では調べられていない。本研究では、*W. metallidurans* からPHB結合蛋白質と考えられる遺伝子のクローニングを行い、その遺伝子産物の性質を調べた。【方法と結果】*W. eutropha* のPhaPと*Rhodospirillum rubrum* のPHB分解酵素活性化因子(ApdA)のアミノ酸配列を基にBLAST searchを行った。その結果、*W. metallidurans* からPhaPとApdAに類似したアミノ酸配列を持つ二つの遺伝子を見いだし、それぞれを*gap1*および*gap2*と名づけた。GAP1のアミノ酸配列は、GAP2のアミノ酸配列と27%のidentityを示し、PhaP1と92%のidentityを示した。GAP2のアミノ酸配列は、ApdAと34%のidentityを示し、PhaP4と22%のidentityを示した。両遺伝子をPCRによりクローニングした後に大腸菌で発現させて精製した。GAP1の分子質量は約24 kDaであり、GAP2の分子質量は約18 kDaであった。GAP2は、native PHB granuleを基質とした時に*R. rubrum* のPHB分解酵素を活性化したが、GAP1は活性化しなかった。抗GAP2抗体を用いた免疫染色の結果、GAP2は可溶性画分よりもPHB inclusion bodyの画分に多く認められた。

PHB granule associated protein from *Wautersia metallidurans* CH34

○Masahiro OHNIWA¹, Teruyuki KOBAYASHI²,
Chieko MATSUSAKI², Terumi SAITO²
(¹Dept. Biol. Grad. Sch., Kanagawa Univ., ²Dept. Biol. Sci., Kanagawa Univ.)

Key words PHB, *Wautersia metallidurans* CH34, PHB granule associated protein

2C11-1 *Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PHA 重合酵素の 3HB ユニット取り込み能力の増強

○佐々木 雄大, 田口 精一
(北大院・工・生物機能高分子)

(目的) *Pseudomonas* sp. 61-3由来のPHA重合酵素は、短鎖長の3-ヒドロキシブタン酸(3HB)と、中鎖長の3-ヒドロキシアルカン酸もモノマーユニットとして取り込むことのできるユニークな酵素である。しかし、3HBの取り込み能力は微弱なため、この能力を増強し、多様なPHAを創製することを目的とする。これまでの研究から、本酵素中の4つの部位(E130、S325、S477、Q481)が基質特異性やPHA重合活性に関与していることがわかった。さらに、各部位での総アミノ酸置換や、優良変異の組合せによって、多くの進化酵素が獲得されつつある。本研究では、触媒残基(H479)近傍に位置するS477とQ481におけるアミノ酸置換の効果を、E130とS325における優良変異との関係性から解析した。(方法および結果) 野生型、E130D、S325C、S325Tの4種類をベースとし、S477とQ481に全てのアミノ酸置換が同時に発生する部位指定飽和変異を、PCR法によって導入した。優良変異体は、P(3HB)の合成量の高さを指標にした。まず、プレート上でポリマー染色用色素を利用して候補体を選別し、次いで定量HPLCを用いてハイスループットの優良変異体を取得し、塩基配列を解析した。その結果、ベースの各変異より高い3HB取り込み能力を示すものが異なるパターンで多く出現し、最高で野生型に比べ500倍を示す変異体が創出された。現在、2重変異(E130D/S325C、E130D/S325T)をベースとした組合せからもさらに合成能力の高い変異体が得られている。また、これらの進化酵素を用いて、PHAを作製し、その生産量やモノマー組成比の測定も検討している。

Enhancement of 3HB units-incorporating ability of *Pseudomonas* sp. 61-3 PHA synthase

○Takahiro SASAKI, Seiichi TAGUCHI
(Dept. Eng., Div. Biotech. Macromol. Chem., Hokkaido Univ.)

Key words PHA synthase, substrate specificity

2C11-3 *Aeromonas caviae* PHA 重合酵素への飽和変異導入と基質特異性の変化

○渡辺 心子¹, 平石 友裕², 土肥 義治², 柘植 丈治¹
(¹東工大院・総理工, ²理研)

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、多くの微生物が炭素源およびエネルギー源として菌体内に蓄積するバイオポリエステルであり、生分解性プラスチックとしての利用が期待されている。PHA重合酵素には、短鎖長(C3~5)のモノマーを重合するタイプI酵素と、中鎖長(C6~14)のモノマーを重合するタイプII酵素が存在する。以前の研究において、タイプIとタイプII PHA重合酵素では、活性ヒスチジン残基の2残基下流にあるアミノ酸が基質認識に関与していることが明らかにされた。そこで本研究では、タイプIとタイプIIの両方の性質を示す*Aeromonas caviae* 由来PHA重合酵素(PhaC_{Ac})について、同じ位置にある505位のアラニン(A505)に対して飽和変異導入を行い、その基質特異性の変化を調べることにした。【方法・結果】PhaC_{Ac}のA505に対して飽和変異導入した酵素を発現するプラスミドを作成し、PHA蓄積欠損株*Ralstonia eutropha* PHB⁻4に導入した。組換え株をフルクトースおよび大豆油を炭素源として培養し、PHA分子量、PHA含率の測定、PHA組成分析を行った。大豆油を炭素源とした場合、すべての変異酵素が野生型よりも高い組成比でC4モノマーをPHA中に取り込んだ。また、PHA分子量を測定した結果、塩基性アミノ酸および疎水性アミノ酸に置換した変異酵素が、野生型に比べて若干高いPHA分子量を示した。

Mutation Effects of a Conserved Alanine (A505) in Polyhydroxyalkanoate Synthase from *Aeromonas caviae* on Polyester Biosynthesis

○Shinko WATANABE¹, Tomohiro HIRAISHI², Yoshiharu DOI²,
Takeharu TSUGE¹
(¹Dept. Innov. Eng. Mat., Tokyo Inst. Technol., ²RIKEN)

Key words PHA copolymer, *Aeromonas caviae*, saturation mutagenesis, substrate specificity