

2Ba09 クラスⅣ重合酵素が示す PHA 分子量低下能とその発現因子の解明

○百武 真奈美¹, 富澤 哲¹, 水野 康平², 柘植 丈治¹
(¹東工大院・総理工, ²北九州高専・物化)
hyakutake.m.aa@m.titech.ac.jp

【緒言】環境調和型ポリエステルとして利用可能なポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、多くの微生物細胞内において生体内高分子として蓄積される。PHA の重合反応を担う重合酵素はサブユニットの構成や基質特異性に応じて4つのクラスに分類されている。これまでの研究から、クラスⅣに分類される *Bacillus cereus* YB-4 由来重合酵素 (PhaRC_{YB4}) は、他の多くの重合酵素とは異なり PHA 分子量低下能を有することが示唆されている。本研究では、同じくクラスⅣに分類される *B. megaterium* 由来重合酵素 (PhaRC_{Bm}) が PHA 分解能を有する可能性について検討した。また、得られた結果から分子量低下能発現の要因について考察した。

【方法】PhaRC_{Bm} の活性中心であるシステイン残基をセリンに置換した重合不活性酵素と他の活性型重合酵素を共発現する大腸菌株を構築し、グルコースを炭素源として蓄積された PHA の含有率および分子量を測定した。また、PhaRC_{YB4} または PhaRC_{Bm} を発現する遺伝子組換え大腸菌株の重合酵素活性を比較した。

【結果・考察】分子量測定の結果、重合酵素を共発現させた大腸菌株が蓄積する PHA の分子量は、培養時間の経過に伴い低下することが確認された。同様な分子量低下は PhaRC_{YB4} の変異型酵素において確認されているが、クラスⅠ重合酵素である *Ralstonia eutropha* 由来重合酵素の変異型酵素では確認されなかった。一方で、PhaRC_{YB4} でみられた PHA 分子量低下能を PhaRC_{Bm} も有することが示唆され、分子量低下能はクラスⅣ重合酵素共通である可能性が考えられた。

Study on molecular weight decrease of PHA synthesized by class IV PHA synthases

○Manami Hyakutake¹, Satoshi Tomizawa¹, Kouhei Mizuno², Takeharu Tsuge¹
(¹Dept. Innov. Eng. Mat., Tokyo Inst. Technol., ²Dept. Mat. Sci. Chem. Eng., Kitakyushu Natl. Col. Tech.)

Key words polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, *Bacillus*, molecular weight

2Ba11 水素細菌 *Ralstonia eutropha* 補充経路改変株の増殖特性およびポリヒドロキシアルカン酸生成能の解析

○清水 理恵, 折田 和泉, 中村 聡, 福居 俊昭
(東工大院・生命理工・生物プロセス)
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】微生物がエネルギー貯蔵物質として生合成するポリヒドロキシアルカン酸は生分解性バイオマスプラスチックとしての実用化が期待されている。本研究ではポリ ((R)-3-ヒドロキシシブタン酸) [P(3HB)] 生産菌として知られる水素細菌 *R. eutropha* について、補充経路改変が増殖および P(3HB) 生合成能に与える影響の検討を行った。

【方法および結果】*R. eutropha* H16 株において補充経路への関与が推定されるホスホエノールビン酸カルボキシラーゼ (Ppc)、ホスホエノールビン酸カルボキシキナーゼ (Pck)、ピルビン酸カルボキシラーゼ (Pyc) の単独遺伝子破壊株および二重・三重破壊株を作製し、フルクトースを炭素源とした窒素源制限無機塩培地における増殖について検討した。その結果、*pck* および *pyc* の破壊による影響は見られなかったが、*ppc* の破壊によって増殖速度が低下した。さらに *ppc*・*pyc* の二重破壊によって増殖速度が大きく低下し、本菌において Ppc が主要、Pyc が補助的な補充酵素として機能することが示された。興味深いことに Δppc 株は窒素源十分条件でも P(3HB) を高度に蓄積し、窒素源濃度による P(3HB) 生合成の制御が解除されていた。また Δppc 株は酵母エキスの栄養源を少量添加することで野生株と同等の生育能を示し、P(3HB) 蓄積率が野生株と比べて約10%増加した。これらのことから、フルクトース生育時には Ppc による主要補充経路を遮断することでアセチル-CoA から P(3HB) への代謝フラックスが向上することが考えられた。

Effects of modification of anaplerotic pathway on growth and polyhydroxyalkanoate biosynthesis in H₂-oxidizing bacterium *Ralstonia eutropha*

○Rie Shimizu, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
(Dep. Bioen., Tokyo Inst. Technol.)

Key words biodegradable plastic, polyhydroxyalkanoate, anaplerotic pathways

2Ba10 PHA 顆粒結合タンパク質による PHA 重合酵素の活性化とその解析

○牛丸 和乗, 渡辺 世利子, 柘植 丈治
(東工大院・総理工)
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【諸言】ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は糖や植物油といったバイオマス資源から微生物合成可能な生分解性プラスチックであり、低環境負荷な高分子材料として注目を集めている。この PHA の生合成において最も重要な役割を果たすのが PHA 重合酵素 (PhaC) である。PhaC 以外にも PHA 生合成に関するタンパク質は多数知られており、例として生体内で生成される PHA 顆粒に結合し、顆粒サイズ制御に関与していると考えられる PHA 顆粒結合性タンパク質であるフェイシン (PhaP) などが挙げられる。本研究ではアフィニティークロマトグラフィーにより精製した *Aeromonas caviae* 由来 PhaC および PhaP と、化学合成により調製したモノマーから成る in vitro 反応系を用いて重合活性の評価を行った。【方法および結果】遺伝子組換え大腸菌を用いて発現後、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した *Aeromonas caviae* 由来 PhaC の重合活性を同 *A. caviae* 由来の精製 PhaP 存在下で測定したところ、PhaP 濃度に依存して PhaC による重合反応が活性化されることを見出した。また、この現象の更なる解析として異なる微生物である *Ralstonia eutropha* 由来の精製 PhaC を用いた解析も行ったところ、PhaP による活性化は確認されず、逆に PhaP 濃度依存的な重合阻害効果を示した。*A. caviae* 由来 PhaC と *R. eutropha* 由来 PhaC は同様の Class I 型の PhaC に分類されており、そのアミノ酸配列も類似している (Identity : 42 %, Similarity : 78 %) に関わらず、PhaP による活性化効果は共通ではないことが分かった。

An *in vitro* study of PHA synthase activation by PHA binding protein

○Kazunori Ushimaru, Yoriko Watanabe, Takeharu Tsuge
(Dept. Innov. Eng. Mater., Tokyo Inst. Technol.)

Key words polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, phasin

2Ba12 CoA 転移酵素を用いた大腸菌による 3-ヒドロキシシブタン酸の生産

○大井 俊彦, 松本 謙一郎, 大慶 岳洋, 本間 以祝, 田口 精一
(北大院・工・生機高)
staguchi@eng.hokudai.ac.jp

【目的】3-ヒドロキシシブタン酸 (3HB) は、光学活性を有するヒドロキシ酸であり、抗生物質や生理活性物質などのキラル合成の出発材料として有用な化合物である。微生物発酵による 3HB 生産は、キラル選択性の高い酵素反応を利用するため光学純度の高い 3HB を合成できる利点を持つ。グルコースを炭素源とした 3HB 生産は、代謝過程で生じるアセチル CoA (Ac-CoA) から、ポリヒドロキシシブタン酸 [P(3HB)] 生合成経路で生じるモノマー (3HB-CoA) を重合したポリマー [P(3HB)] を加水分解する方法、3HB-CoA を加水分解する方法などが知られている。高エネルギー化合物である 3HB-CoA からエネルギー損失なしに Ac-CoA を生成出来れば、副製した Ac-CoA は 3HB 生産系に向かい効率的な 3HB 生産利用できると考えられる。本研究では、新しい 3HB 生産システムとして、プロピオニル CoA 転移酵素 (PCT) を利用した Ac-CoA 副製系を用いた効率的な生産法について検討した。

【方法と結果】P(3HB) 生合成遺伝子 (*phaA*, *phaB*) および PCT 遺伝子を導入した組換え大腸菌を、グルコースを含む LB 培地を用いて培養した。培養上清の 3HB は HPLC により定量した。グルコースのみを炭素源とした場合、3HB は 1 g/L 生産されたが、グルコースと酢酸を培地に添加した場合、3HB 生産は最大で 5.2 g/L まで上昇した。

Production of 3-hydroxybutyric acid using CoA transferase

○Toshihiko Ooi, ken'ichiro Matsumoto, Takehiro Ohkei, Inori Honma, Seiichi Taguchi
(Div. Biotech. Macromol. Chem., Gard. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words (R)-3-hydroxybutyric acid, CoA transferase, Chiral compound, Acetic acid