

1P-240 Ralstonia eutrophaでの共重合ポリヒドロキシアルカン酸生成における顆粒結合タンパク質の影響解析

○川島 由依, 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】環境調和型ポリマー素材であるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の中で、ポリ ((R)-3- ヒドロキシブタン酸-co-(R)-3- ヒドロキシヘキサノ酸) [P(3HB-co-3HHx)] は柔軟性に優れ、実用化に適した物性を示す。我々はこれまでに PHA 生産菌 *Ralstonia eutropha* の改変により P(3HB-co-3HHx) を植物油から効率的に生産する株を作製してきた。近年、PHA 顆粒結合タンパク質 phasin (PhaP) により PHA シンターゼ (PhaC) の活性が変化することが *in vitro* で示されている。そこで本研究では、由来の異なる phaP への置換が *R. eutropha* での *in vivo* P(3HB-co-3HHx) 合成におよぼす影響を検討した。
【方法および結果】*Aeromonas caviae* 由来 phaC_{NSDG} および phaJ_{Ac} を染色体に導入した *R. eutropha* 株において、ネイティブな主要 phasin 遺伝子である phaP_{I_{Re}} を *A. caviae* 由来 phasin 遺伝子である phaP_{Ac} に置換すると、大豆油から合成された P(3HB-co-3HHx) の 3HHx 分率が有意に増加し、興味深いことに数平均分子量も増加することを見出した。また phaP_{I_{Re}} (または phaP_{Ac}) 下流に phaC_{NSDG}-phaJ_{Ac} を挿入した株では 3HHx 分率の大幅な増加と phaC 高発現のためと推定される分子量低下が観察されたが、この際でも phaP_{Ac} 置換株の方がより高い 3HHx 分率を示した。これらの結果から、PhaC_{NSDG} は PHA 顆粒表面上で PhaP_{Ac} と相互作用することで共重合特性が変化していることが示唆された。現在、各組換え株から PHA 画分を調整し、その重合活性について検討を行っている。

Effects of granule-associated protein on polyhydroxyalkanoate copolymer biosynthesis in *Ralstonia eutropha*

○Yui Kawashima, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words biodegradable plastic, *Ralstonia eutropha*, phasin, polyhydroxyalkanoate

1P-242 Ralstonia eutrophaを宿主とした糖および炭酸ガスからのポリヒドロキシアルカン酸生成

○脇田 和¹, 外村 彩夏¹, 岩崎 美佳¹, 田中 賢二², 福居 俊昭³, 柘植 丈治⁴, 松崎 弘美⁵
(¹熊本県大院・環境共生, ²近大・産理工・生物環境化学, ³東工大院・生命理工, ⁴東工大院・総理工, ⁵熊本県大・環境共生)
matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【目的】*Ralstonia eutropha* は糖や炭酸ガスを唯一の炭素源として、菌体内にポリ (3- ヒドロキシブタン酸) (P(3HB)) を合成する。そこで、本菌の組換え株を作製し、脂肪酸合成経路を介して炭素数 4 ~ 12 の 3- ヒドロキシアルカン酸 (3HA) からなる P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルを合成を目的とした。
【方法および結果】当研究室では、大腸菌を宿主として *Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子、3- ヒドロキシアル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子、3HB ユニット供給系酵素遺伝子、および *Pseudomonas aeruginosa* の推定 3- ヒドロキシアル CoA リガーゼ遺伝子を導入した組換え株を作製し、中鎖長 3HA ユニットが取り込まれた P(94.6% 3HB-co-5.4% 3HA) 共重合ポリエステルの合成に成功している¹⁾。そこで、*R. eutropha* の PHA 合成能欠損株に同様の遺伝子を導入した株を作製した。この組換え株を糖を唯一の炭素源として培養した結果、PHA の蓄積率は向上したが中鎖長 3HA ユニットの PHA 鎖中への取り込みは見られなかった。現在、さらなる検討を行っている。

1) 外村ら, 日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集

Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate by *Ralstonia eutropha* from sugar or carbon dioxide as a sole carbon source.

○Izumi Wakida¹, Ayaka Hokamura¹, Mika Iwasaki¹, Kenji Tanaka², Toshiaki Fukui³, Takeharu Tuge⁴, Hiromi Matsusaki⁵
(¹Grad. Sch. Environ. Sym. Sci. Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto., ²Dept. Biol. Environ. Chem., Fac. Humanity-Oriented. Sci. Eng., Kinki Univ., ³Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech, ⁴Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech, ⁵Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

Key words polyhydroxyalkanoate, PHA, *Ralstonia eutropha*, biodegradable plastic

1P-241 組換え大腸菌による脂肪酸合成経路を介した生分解性共重合ポリエステル

○外村 彩夏¹, 脇田 和¹, 柘植 丈治², 松崎 弘美³
(¹熊本県大院・環境共生, ²東工大院・総理工, ³熊本県大・環境共生)
matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、環境調和型プラスチックとして期待されている。本研究では、大腸菌を宿主として、糖を唯一の炭素源として 3- ヒドロキシブタン酸 (3HB) ユニットと中鎖長 3- ヒドロキシアルカン酸 (3HA) ユニットが取り込まれた物性の優れた共重合ポリエステル P(3HB-co-3HA) を合成することを目的とした。
【方法および結果】*Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子 (phaC1) および脂肪酸合成経路から中鎖長 3HA ユニートを供給する 3- ヒドロキシアル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (phaG)、*Ralstonia eutropha* の 3HB ユニット供給系酵素遺伝子 (phbAB) を導入したプラスミド pJScK-C1GAB を構築した。また、*Pseudomonas aeruginosa* PAO あるいは *P. putida* NBRC100650 の推定 3- ヒドロキシアル CoA (3HA-CoA) リガーゼ遺伝子を pBBR1MCS-3 ベクターに導入したプラスミドを構築し、これらの各プラスミドを pJScK-C1GAB とともに大腸菌に導入した組換え株を作製した。さらには、*Pseudomonas* sp. 61-3 の phaC1、phaG 遺伝子、*P. aeruginosa* PAO の推定 3HA-CoA リガーゼ遺伝子、*R. eutropha* の phbAB 遺伝子を pBBR1MCS-2 に挿入したプラスミドを構築し、大腸菌に導入した。糖を唯一の炭素源として培養した結果、3HA-CoA リガーゼ遺伝子導入株では、炭素数が 8 ~ 10 (14) の 3HA ユニットが 5.4 mol% 取り込まれた P(3HB-co-3HA) が合成された。

Biosynthesis of biodegradable copolymers by recombinant *Escherichia coli* through fatty acid synthesis pathway

○Ayaka Hokamura¹, Izumi Wakida¹, Takeharu Tsuge², Hiromi Matsusaki³
(¹Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, ²Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech, ³Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

Key words polyhydroxyalkanoate, PHA, biodegradable plastic

1P-243 Lactobacillus acetotolerans HT の乳酸脱水素酵素遺伝子を利用した乳酸ユニットを含む生分解性プラスチックの合成

○後藤 早希¹, 佐藤 美咲², 田中 賢二³, 松本 謙一郎⁴, 田口 精一⁴, 松崎 弘美²
(¹熊本県大院・環境共生, ²熊本県大・環境共生, ³近大・産理工・生物環境化学, ⁴北大院・工・生機高)
matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【目的】*Lactobacillus acetotolerans* HT は、pH 2.9 の酸性下でも生育できる耐酸性乳酸菌である。本研究では、本菌の D- および L- 乳酸脱水素酵素 (D-LDH および L-LDH) 遺伝子をクローニングし、D-LDH 遺伝子 (ldhD) を利用した乳酸 (LA) ユニットを含む生分解性プラスチックの合成を試みた。
【方法および結果】乳酸菌の D-LDH および L-LDH の保存領域に基づいてプライマーを設計し、degenerate および inverse PCR を行って、HT 株の D- および L-LDH 遺伝子をクローニングした。ポリヒドロキシアルカン酸生成関連遺伝子を保持するプラスミド pTV118NpctC1AB(STQK)¹⁾ から *Ralstonia eutropha* 由来のプロモーターを除き、*Lb. acetotolerans* HT の ldhD 遺伝子を挿入したプラスミドを導入した組換え大腸菌を作製した。これを 2% グルコース含有 LB 培地にて、好氣的または微好氣的に培養した。その結果、組換え株は LA ユニットと 3- ヒドロキシブタン酸 (3HB) ユニットからなる共重合ポリエステル P(LA-co-3HB) を合成した。微好氣的条件ではポリエステル蓄積率は約 10 wt% と低いが、LA 分率が約 30 mol% からなるポリエステルを合成した。

1) Taguchi, S. *et al.*, PNAS, 105, 17323 (2008)

Biosynthesis of lactate-based polyester using lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus acetotolerans* HT

○Saki Goto¹, Misaki Sato², Kenji Tanaka³, Ken'ichiro Matsumoto⁴, Seiichi Taguchi⁴, Hiromi Matsusaki²
(¹Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, ²Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, ³Dept. Biol. Environ. Chem., Fac. Humanity-Oriented. Sci. Eng., Kinki Univ., ⁴Div. Biotechnol. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words biodegradable plastic, lactate dehydrogenase, *Lactobacillus acetotolerans*