

- 903 *Pseudomonas* sp. 61-3株のポリヒドロキシアルカン酸生合成系遺伝子の解析と新規組成比からなる共重合ポリエステルの生合成
(科技団CREST、理研・高分子化学)
○松崎弘美、福居俊昭、田口精一、土肥義治

【目的】 *Pseudomonas* sp. 61-3はポリ-3-ヒドロキシブタン酸 (P(3HB)) と炭素数4から12の3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) からなる共重合ポリエステル (P(3HB-co-3HA)) とのブレンド体を別々のグラニュール (顆粒) として蓄積する。これは、2種類のポリエステル生合成系遺伝子を有しているためである¹⁾。本研究では、生合成系遺伝子の解析を行い、さらには、ポリエステル合成酵素 (PHA synthase) 遺伝子を用いた遺伝子工学的手法により、新規組成比からなるP(3HB-co-3HA)の生合成について検討した。

【方法及び結果】 菌体破砕物のスクロース密度勾配による超遠心分離により、2つのポリエステル顆粒を分離した。これらをガスクロマトグラフィーにより分析した結果、それぞれP(3HB)、P(3HB-co-3HA)であることがわかった。P(3HB)顆粒表面には分子量26kDaの顆粒結合タンパク質 (GA26) が、P(3HB-co-3HA)には18kDa、36kDaの顆粒結合タンパク質 (GA18およびGA36) が存在し、GA18およびGA36の遺伝子はP(3HB-co-3HA)生合成系遺伝子群における*phaD*遺伝子の下流に逆向きに位置し、PHA生合成に関係があると予想された。一方、PHA synthase遺伝子と *Ralstonia eutropha*由来の β -ケトチオラーゼ、アセトアセチルCoAリダクターゼの両遺伝子を連結したプラスミドを構築し、組換え微生物によるポリエステル生合成について検討したところ、組換え *R. eutropha*において植物油を炭素源に3HB分率が50~85mol%からなるP(3HB-co-3HA)が合成された。得られた共重合ポリエステルは多様な物性を有していた。

1) Matsusaki *et al.* *J. Bacteriol.*, 180, 6459-6467 (1998)

Analysis of polyhydroxyalkanoate biosynthetic genes of *Pseudomonas* sp. 61-3 and biosynthesis of copolyesters with novel monomer compositions.

○Hiromi Matsuaki, Toshiaki Fukui, Seiichi Taguchi, Yoshiharu Doi (JST-CREST, Polym. Chem. Lab., RIKEN)

[Key words] polyhydroxyalkanoate, PHB, PHA, *Pseudomonas*

- 904 *Aeromonas caviae*ポリエステル合成系遺伝子導入株によるポリエステル合成とポリエステル合成酵素活性の生合成過程における影響
○吉瀬智康^{1,2}、福居俊昭²、田口精一²、土肥義治^{1,2}
(¹埼玉大院理工、²理研・高分子化学)

【目的】 土壌より単離された *A. caviae* FA440株は、油脂や脂肪酸を炭素源として(R)-3-ヒドロキシブタン酸(3HB)と(R)-3-ヒドロキシヘキサノ酸(3HHx)からなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HHx)を生合成する。*A. caviae*由来ポリエステル合成系遺伝子およびその欠失クローンを *Ralstonia eutropha*あるいは *A. caviae*由来ポリエステル合成系遺伝子プロモーターの支配下に配置し、ポリエステル合成能欠損株である *R. eutropha* PHB⁻4株に導入した。作製した組換え株におけるポリエステル合成酵素活性測定を行い、プロモーターの違いによるポリエステル生合成への影響を検討した。

【方法及び結果】 プロモーターが異なる2株について、菌体粗抽出液中の合成酵素活性の経時変化を測定したところ、*A. caviae*由来プロモーターを有する組換え株では誘導的な活性の増大が認められた。一方、*R. eutropha*由来プロモーターを有する組換え株では、構成的であった。また、合成酵素活性と菌体内ポリエステルの平均蓄積速度が相関しないことから、ポリエステル合成の律速段階は重合段階ではなく、基質供給段階にあることが推測された。

Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* harbouring *Aeromonas caviae* PHA genes and effects of PHA synthase activity on the biosynthesis process

○Tomoyasu Kichise^{1,2}, Toshiaki Fukui², Seiichi Taguchi², Yoshiharu Doi^{1,2} (¹Dept. Biol. Environ. Sci., Saitama Univ., ²Polym. Chem. Lab., RIKEN)

【Key Words】 polyhydroxyalkanoate, *Aeromonas caviae*, recombinant *Ralstonia eutropha*, PHA synthase activity