

論文の内容の要旨

論文題目 微生物によるポリヒドロキシアルカン酸生産機構の解析とその応用

氏名 松本 謙一郎

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、微生物が炭素源とエネルギーの貯蔵物質として細胞内に蓄積するポリエステルである。PHA は熱可塑性、生体適合性、生分解性をもち、石油化学製品に代わるプラスチック材料としての利用が期待されている。最初に発見された PHA は、3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) が重合したポリ3-ヒドロキシブタン酸 [P(3HB)] である。P(3HB) は粘弾性が低くフィルムの作成には適さないが、3HB を主モノマーとし、少量の中鎖の3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) を含む共重合体 [P(3HB-co-3HA)] は、ポリプロピレンに機械的性質が近く、しなやかで強い材料となる。PHA を実用化するためには、優れた物性をもつ PHA を安く大量に作る必要がある。

次頁の Figure 1 には PHA の生合成経路を示している。PHA は、炭素数4~12の3-ヒドロキシアルキルC o Aを基質として PHA 重合酵素 (PhbC, PhaC or PHA synthase) によって合成される。重合酵素は基質のC o Aを遊離してエステル結合を形成する。重合酵素の種類によって、基質として取り込むことのできる3-ヒドロキシアルキルC o Aが異なっている。P(3HB)は、3-ヒドロキシブチリルC o Aにのみ基質特異性を持つタイプ1の重合酵素によって合成される。P(3HA)は、炭素数が6~12の3-ヒドロキシアルキルC o Aに基質特異性をもつタイプ2の重合酵素によって合成される。炭素数4の基質となる3-ヒドロキシブチリルC o Aは、アセチルC o Aを出発物質として β -ケトチオラーゼ (PhbA) による二量化と、アセトアセチルC o Aレダクターゼ (PhbB) による還元を経て合成される。

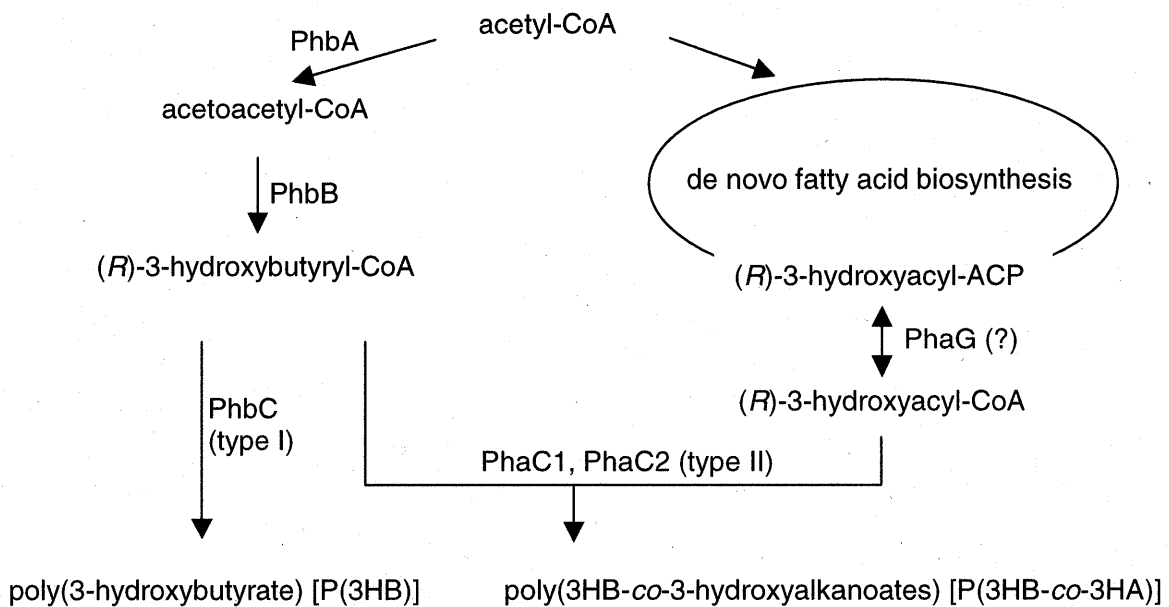


Figure 1. Metabolic pathways of PHA biosynthesis

Pseudomonas sp. 61-3 は好気性の土壌細菌で、窒素源制限培地で糖または脂肪酸を炭素源として培養すると PHA を蓄積する。この菌はタイプ 1 とタイプ 2 の重合酵素を持っているために、P(3HB) と P(3HB-co-3HA) の 2 種類の PHA を同時に蓄積する。*Pseudomonas* sp. 61-3 の重合酵素 (PhaC1, PhaC2) はアミノ酸の一次配列ではタイプ 2 に分類されるが、炭素数が 4 ~ 12 のモノマーユニットを含む共重合体 [P(3HB-co-3HA)] を作るという珍しい性質を持っている。*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 合成系の遺伝子は、3-ヒドロキシブチリル CoA を供給する *phbAB* 遺伝子と、2 種類の重合酵素遺伝子がこれまでにクローニングされているが、炭素数が 6 以上の中長鎖の 3-ヒドロキシアシル CoA を供給する代謝経路は明らかにされていない。この PHA 合成メカニズムを明らかにすれば、異なった宿主での機能性に富んだ PHA の効率的な生産に応用できると期待される。そこで本研究では、*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 生合成メカニズムの解析と、それを応用した異宿主での PHA 生産を検討した。

1. *phaG* 遺伝子のクローニングと PHA 生合成への関与

3-ヒドロキシアシル ACP / CoA トランスフェラーゼ (PhaG) は、de novo 脂肪酸合成系の中間体である 3-ヒドロキシアシル ACP を、3-ヒドロキシアシル CoA に変換するトランスアシラーゼである (ACP = アシルキャリアプロテイン)。*Pseudomonas* sp. 61-3 は糖を炭素源として 3HA ユニットを含む PHA を合成することから、PhaG が 3-ヒドロキシアシル CoA の供給経路になっていると推定された。そこで、*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA ライブラリーを用いて、*P. putida* の *phaG* 遺伝子をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行い、*phaG* 遺伝子を含む DNA 断片をクローニングした。クローニングした DNA の塩基配列を解析し、推定アミノ酸配列を決定した。

次いで、クローニングした *phaG* 遺伝子が PHA 生産に関与しているか調べるために、*Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaG* 遺伝子破壊株を作成した。遺伝子破壊株の作成にはトランスポゾ

ンを持つ自殺ベクターを用い、大腸菌を介した接合伝達によって *Pseudomonas* sp. 61-3 に導入した。*Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株のゲノム DNA を抽出し、*phaG* 遺伝子をプローブとしてサザン解析を行い、*phaG* 遺伝子が破壊されたことを確認した。

Pseudomonas sp. 61-3 の野生株、*phaG* 破壊株と、それぞれに *phaG* 遺伝子をセルフクローニングした株について PHA 生産を検討した。Nutrient Rich 培地 (NR) で前培養した菌体を、2% グルコン酸ナトリウムを含む窒素制限無機塩培地で 72 時間培養し、PHA を蓄積させた。結果を Table 1 に示す。野生株が 3HB 47 mol%, 3HA 53 mol% の PHA を 23 wt% 蓄積するのに対し、*Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaG* 破壊株は 3HB 92 mol%, 3HA 8 mol% の PHA を蓄積したことから、糖を炭素源とした際に PhaG が 3-ヒドロキシアシル CoA の主要な供給経路となっていることが確認された。また、*phaG* 遺伝子をセルフクローニングした株は 3HB 20 mol%, 3HA 80 mol% の PHA を 42 wt% 蓄積し、3HA 分率と PHA の蓄積量が大幅に上昇した。

Table 1. Accumulation of PHA by wild-type and recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3 harboring the *phaG_{Ps}* gene

strain	plasmid	cell dry weight (g/l)	PHA content (wt%)	PHA composition (mol%)	
				3HB (C ₄)	3HA (C ₆ —C ₁₂)
野生株	control plasmid	1.04	23	47	53
	<i>phaG</i> 遺伝子	1.08	42	20	80
<i>phaG</i> 破壊株	control plasmid	0.90	19	92	8
	<i>phaG</i> 遺伝子	1.04	42	17	83

リン脂質合成に関わるアシルトランスフェラーゼは、His と Asp の二つのアミノ酸残基が活性中心であるということが報告されている。PhaG も類似のアシル転移反応を行うことから、この酵素においても His 残基と酸性残基が活性に重要な役割を果たしている可能性が推定された。そこで、PCR を用いて PhaG のアミノ酸置換変異酵素を作成し、作成した変異酵素遺伝子を *Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaG* 破壊株に導入し、中鎖長の 3HA 分率の上昇によって PhaG 変異酵素の活性を判断した。His 残基を Ala 残基に変換した変異酵素遺伝子を導入した株は *phaG* 遺伝子破壊株を全く相補しなかった。このことから、この His 残基は PhaG の活性に重要な役割を果たしていることがわかった。一方、PhaG の Glu 残基は Gln 残基に変換しても PHA の蓄積に大きな変化はなく、このアミノ酸残基は PhaG の活性には大きな影響を与えないことがわかった。以上より、PhaG の活性に必要な His 残基を同定したが、その反応メカニズムはリン脂質合成を行うアシルトランスフェラーゼとは異なっていることが示唆された。

重合酵素の活性は PHA の蓄積量や組成に大きく影響すると考えられるが、これまでに *Pseudomonas* sp. 61-3 の重合酵素活性は測定されていなかった。そこで、*Pseudomonas* sp. 61-3 の重合酵素 (PhaC1, PhaC2) の活性測定を行った。基質となる炭素数が 4 ~ 12 (偶数) の 3-ヒドロキシアシル CoA を合成し、重合反応によって遊離される CoA の量を定量して、各基質に

対する相対活性を求めた。その結果、*Pseudomonas* sp. 61-3 の重合酵素は3-ヒドロキシデカノイルC₁₀A (C₁₀) に最も活性が高かった。また、重合酵素の各基質に対する相対活性と、PHA のモノマーの組成比が、3-ヒドロキシブタン酸を除いて凡そ一致することがわかった。しかし、合成されるPHAには3-ヒドロキシブタン酸がモノマーとして含まれているにも関わらず、3-ヒドロキシブチリルC₄Aに対する活性は検出できなかった。

2. *phaG* 遺伝子の異宿主発現と PHA 生産

Pseudomonas sp. 61-3 は優れた物性の PHA を合成することができるが、PHA の蓄積量は 50 wt%が上限であり、大量生産に用いる宿主としては適していない。一方、*Ralstonia eutropha* は、糖または脂肪酸を炭素源として 80 wt%以上の PHA を蓄積する非常に効率の良い PHA 生産菌である。*R. eutropha* は3-ヒドロキシブチリルC₄Aを供給する *phbAB* 遺伝子と、タイプ1の重合酵素遺伝子を持ち、P(3HB)を合成することができる。しかし、糖を炭素源として3-ヒドロキシアシルC₆Aを供給する代謝経路が存在しないため、糖から共重合体 [P(3HB-co-3HA)] を合成することはできない。そこで *R. eutropha* の PHA 重合酵素遺伝子破壊株 (PHB⁻4) に *Pseudomonas* sp. 61-3 由来の重合酵素遺伝子 (*phaC1*) と *phaG* 遺伝子を導入し、フラクトースを炭素源とした P(3HB-co-3HA)の合成を検討した。

組換え *R. eutropha* を NR 培地で前培養し、2%フラクトースを含む窒素制限無機塩培地で培養して PHA を蓄積させた。結果を Table 2 に示す。*R. eutropha* PHB⁻4 は重合酵素が破壊されているために PHA を蓄積しないが、*R. eutropha* PHB⁻4 に *phaC1* 遺伝子を導入した株は 9 wt%の P(3HB)を合成した。それに対し、*phaC1G*を導入した株は、PHA の蓄積量が増加し、3.4 mol%の 3HA ユニットを含む P(3HB-co-3HA)を 26 wt%蓄積した。*phaC1G*に加えて *R. eutropha* の3-ヒドロキシブチリルC₄Aを供給する酵素遺伝子 (*phbAB*) をセルフクローニングすると、さらに PHA の蓄積量が 45 wt%まで増加した。

Table 2. PHA Accumulation in recombinant *R. eutropha* PHB⁻4 from fructose

Plasmid	Cell dry weight (g/l)	PHA content (wt%)	PHA composition (mol%)	
			3HB (C ₄)	3HA (C ₆ —C ₁₂)
control plasmid	0.77	0	-	-
<i>phaC1</i>	0.84	9	100	-
<i>phaC1, phaG</i>	1.09	26	96.6	3.4
<i>phaC1, phaG, phbA, phbB</i>	1.36	43	97.1	2.9

3. まとめ

本研究では、*Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaG* 遺伝子を単離し、この遺伝子産物が PHA 生産へ関与していることを示した。さらに、*phaG* 遺伝子を重合酵素遺伝子と共に *R. eutropha* に導入し、糖を炭素源とした新規 PHA の合成を行った。