

論 文 要 旨

論文題目 「ポリヒドロキシアルカン酸生合成遺伝子の解析と共重合
ポリエステル合成細菌の分子育種に関する研究」

氏 名 外村彩夏

多くの微生物がエネルギー貯蔵物質として菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、優れた生分解性を有し、環境調和型プラスチックとして期待されている。PHA の実用化のためには、PHA の物性を改善し、低コストで生産するシステムを構築することが重要である。したがって、PHA 生合成関連遺伝子の詳細な解析が必須であり、それにより得られた知見を基に、その分子構造や組成を自由にコントロールする必要がある。また、安価な炭素源を用いることが循環型社会構築のためにも好ましい。PHA は、炭素数 4 の 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) をモノマー単位とするポリ-3-ヒドロキシブタン酸 P(3HB)と、炭素数 6~14 の中鎖長 3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) をモノマー単位とするポリ-3-ヒドロキシアルカン酸 P(3HA)に大別される。P(3HB)は硬くて脆い性質を示し、一方、P(3HA)はアモルファスでゴム弾性を示すため、それぞれ単独では実用的なプラスチックとはいえない。しかしながら、3HB ユニットと 3HA ユニットのランダム共重合体 P(3HB-co-3HA)を合成させ、その組成比を変化させることによって、硬いものから柔らかいものまで、物性の優れた実用的な PHA を合成することが可能となる。

Pseudomonas sp. 61-3 は、P(3HB)ホモポリマーと、炭素数 4~12 の 3HA からなる P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの 2 種類の PHA を合成する。PHA 生合成に関する遺伝子について、P(3HB-co-3HA)の生合成に関わる *pha* locus と P(3HB)の生合成に関わる *phb* locus の一部がこれまでに同定されている。*Pseudomonas* sp. 61-3 の P(3HB)と P(3HB-co-3HA)の PHA 顆粒にはそれぞれ特異的に結合するタンパク質 Granule-associated protein (GAP) が存在する。PHA 顆粒にはポリエステル重合酵素以外に、分子量 18 kDa の GA18、36 kDa の GA36、24 kDa の GA24、48 kDa の GA48 (porin) が結合することが明らかとなっており、GA18 および GA36 の遺伝子は、*phal* および *phaF* とそれぞれ同定されているが、GA24 遺伝子は同定されていない。また、GAP のポリエステルへの局在性が何に起因しているのかについては不明である。そこで、本研究では、ポリヒドロキシアルカン酸生合成遺伝子の解析と優れた共重合ポリエステル生産菌の分子育種を目的とした。

(1) *Pseudomonas* sp. 61-3 のポリヒドロキシアルカン酸顆粒結合タンパク質遺伝子のクローニングと顆粒結合タンパク質の局在性

GAP は、PHA 顆粒の安定性に関わるだけでなく、PHA 生合成遺伝子の転写調節に関与しているものや PHA 重合酵素の活性を高めるものも知られており、GAP の詳細な機能解析が必要である。これまで、*Pseudomonas* sp. 61-3 の GAP の 1 つである GA24 をコードする遺伝子は同定されていない。そこで、GA24 のアミノ酸配列から degenerate プライマーを作製し、既知の調節タンパク質遺伝子 (*phbR*) の塩基配列プライマーとの PCR を試みた。その結果、約 3.0-kb の増幅産物が得られ、GA24 遺伝子が *phbR* 遺伝子の下流に位置することがわかった (Fig. 1)。さらに、隣接する未知領域を nested PCR を行って、GA24 遺伝子の全塩基配列を決定し、*phbP* と命名した (Fig. 1)。さらに、この *phbP* 遺伝子をプローブとして、本菌のゲノム DNA ライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションを行い、*phbP* 遺伝子の周辺領域をクローニングした結果、*phbP* 遺伝子の下流に *phbF* 遺伝子を発見した (Fig. 1)。*phbP* 遺伝子の推定翻訳産物は、192 アミノ酸残基からなる推定分子量 20.4 kDa のタンパク質 (GA24)、*phbF* 遺伝子の推定翻訳産物は、178 アミノ酸残基からなる推定分子量 19.6 kDa のタンパク質であった。また、相同性検索の結果から、PhbP は PHA 顆粒の安定性に関与している phasin タンパク質、PhbF は *phbP* 遺伝子の転写抑制タンパク質であると予想された。

次に、PHA のモノマー組成とポリエステルの局在性について調べるために、さまざまなモノマー組成の共重合 PHA を合成する *Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株を作製し、それぞれの PHA 顆粒に結合する GAP の局在性について検討した。その結果、GA18 および GA36 は 3HA (C₆~C₁₂) 分率が少なくとも 13 mol% 以上であれば結合し、GA24 は 3HB (C₄) 分率が少なくとも 87 mol% 以上で結合することが明らかとなった。さらに、GAP のポリエステルへの局在性は、ポリエステル重合酵素との相互作用ではなく、GAP 自身がポリエステルのモノマー鎖を認識していると考えられた。

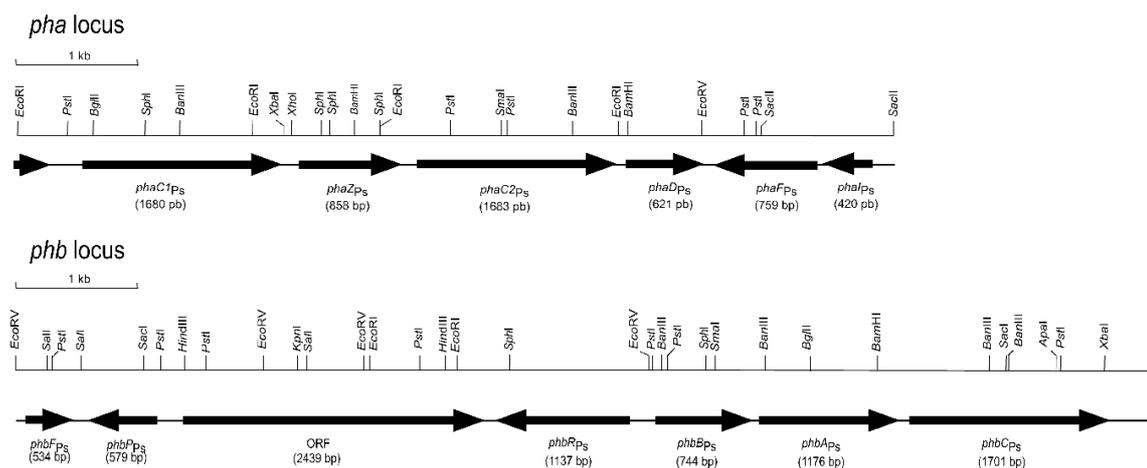


Fig. 1 Organization of *pha* and *phb* loci in *Pseudomonas* sp. 61-3.

The genes located on *pha* and *phb* loci in *Pseudomonas* sp. 61-3 are involved in the biosynthesis of P(3HB-co-3HA) and P(3HB), respectively. In *pha* locus, the genes encoding PHA synthase 1 (PhaC1), PHA depolymerase (PhaZ), PHA synthase 2 (PhaC2), an unknown function protein (PhaD) and PHA granule-associated proteins (PhaI and PhaF) are located. In *phb* locus, the genes encoding a putative negative regulator protein (PhbF) related to the transcription of *phbP* gene, phasin (PhbP), an unknown function protein (ORF), a putative regulator protein (PhbR) related to the transcription of *phbBAC*, NADPH-dependent acetoacetyl coenzyme A reductase (PhbB), β -ketothiolase (PhbA) and PHB synthase (PhbC) are located.

(2) *Pseudomonas* sp. 61-3 のポリヒドロキシアルカン酸生合成遺伝子クラスター上に存在する機能不明遺伝子

Pseudomonas sp. 61-3 の *phb* locus 上に *phbR* 遺伝子と *phbP* 遺伝子の間が約 3kb 離れていることが明らかとなり、この間に機能不明 ORF を新たに見いだした (Fig. 1)。この ORF は、2439 bp、812 アミノ酸残基からなる推定分子量 90.2 kDa のタンパク質をコードすることがわかった。また、RT-PCR により、この ORF の転写が確認されるため、遺伝子として何らかの機能を有していると考えられた。さらには、この ORF の推定翻訳産物はエステラーゼやリパーゼなどに特徴的な α/β ヒドロラーゼドメインを有していることから、PHA 重合酵素あるいは菌体内 PHA 分解酵素であると予想し、*Pseudomonas* sp. 61-3 の ORF 破壊株および ORF 導入組換え株を作製し検討したが、その機能を解明するまでには至らなかった。

(3) 組換え微生物による生分解性共重合ポリエステルの生合成～(R)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子のクローニングと機能解析～

化学合成独立栄養細菌 *Ralstonia eutropha* は、糖や二酸化炭素を炭素源として、P(3HB)ホモポリマーを合成するが、これは、硬くて脆く実用性に乏しい。しかしながら、組換え *R. eutropha* によって、脂肪酸合成経路を介して糖や二酸化炭素から物性の優れた P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルが合成できれば、高度環境調和型の PHA 生産システムを構築できるといえる。そこで、*Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1*) と脂肪酸合成経路からの炭素数 6~12 の 3HA ユニットの供給する 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (*phaG*) を導入した *R. eutropha* の組換え株を作製し、従属栄養あるいは独立栄養条件下にて培養した。その結果、糖を炭素源として培養した場合、中鎖長 3HA ユニットの 2.4 mol%取り込まれた P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルが合成された。このポリエステルの破断伸びは 23%であり、P(3HB)の 5%に対して物性が多少改善された。また、二酸化炭素を炭素源として培養した場合、約 60%の P(3HB)ホモポリマーが合成された。

ここで、PhaG は、トランスフェラーゼ活性よりもチオエステラーゼ活性が高いことが最近報告されたため、中鎖長 3HA ユニットの供給するためには、PhaC1 および PhaG に加えて、(R)-3-ヒドロキシアシル CoA ((R)-3HA-CoA) リガーゼが必要であると考えられた。また、これまで大腸菌を宿主として糖から P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルを合成した報告例はほとんどない。そこで、組換え *R. eutropha* による二酸化炭素からの実用的な PHA 生合成の前段階として、*Pseudomonas aeruginosa* PAO より推定中鎖長アシル CoA リガーゼ遺伝子 (PA3924) をクローニングし、PHA 重合酵素遺伝子とともにモノマー供給系に関わる酵素遺伝子を導入した大腸菌の組換え株を作製し、糖を炭素源として培養した。その結果、PA3924 遺伝子導入株で中鎖長 3HA ユニットの 5.4 mol%導入された P(3HB-co-3HA) が合成され、このポリエステルの破断伸びが 186%と物性がかなり改善された。本研究では、大腸菌を宿主として物性の優れた P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルを糖から合成することに成功した。さらに、PA3924 遺伝子を導入した株が P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルを合成したことから、PA3924 遺伝子の翻訳産物が、(R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有することを初めて明らかにした。

各酵素の特性・特徴について明らかにし、代謝制御を行うことは、優れた物性の PHA の合成と効率的生産につながるといえる。本研究では、安価な糖や二酸化炭素から実用的な生分解性共重合ポリエステルを合成することを最終目標とし、PHA 生合成遺伝子の解析を行い、*phbP* および *phbF* 遺伝子を同定した。さらに、本研究や先行研究の知見に基づいて微生物の分子育種を行った。大腸菌を宿主とした系において、PHA 重合酵素および(*R*)-3HA-CoA リガーゼを導入することで、糖からの共重合ポリエステルの生合成に成功した。脂肪酸合成経路は、いずれの生物も有しているため、今後、化学合成独立栄養細菌である *R. eutropha* を宿主として、二酸化炭素から物性の優れた共重合ポリエステルが合成できれば、高度環境調和型 PHA 生産システムを構築できると考えられる。