

博士論文

乳酸ベースコポリマーの微生物合成に関する研究

**Microbial synthesis of lactate-based copolymers**

熊本県立大学大学院 環境共生学研究科 環境共生学専攻

食品バイオ工学研究室

後藤 早希

2018 年度 (2019 年 3 月)

# 乳酸ベースコポリマーの微生物合成に関する研究

## 目次

	頁
第一章 序論	1
1-1 乳酸と乳酸菌	2
1-2 <i>Lactobacillus acetotolerans</i> について	3
1-3 バイオプラスチック	4
1-4 ポリ乳酸	8
1-5 ポリヒドロキシアルカン酸	9
1-6 乳酸ベースポリマーについて	12
1-7 本研究の目的	15
第二章 耐酸性乳酸菌 <i>Lactobacillus acetotolerans</i> HT の乳酸脱水素酵素 遺伝子のクローニングと同定	17
2-1 緒言	18
2-2 実験操作	19
2-2-1 使用した菌株およびプラスミド	19
2-2-2 菌株の保存	19
2-2-3 D-lactate dehydrogenase 遺伝子 ( <i>ldhD</i> ) のクローニング	20
2-2-4 L-lactate dehydrogenase 遺伝子 ( <i>ldhL1</i> ) のクローニング	22
2-2-5 L-lactate dehydrogenase 遺伝子 ( <i>ldhL2</i> ) のクローニング	25
2-2-6 <i>ldhD</i> 、 <i>ldhL1</i> および <i>ldhL2</i> 遺伝子の異種発現	28
2-3 結果および考察	30
2-3-1 <i>Lb. acetotolerans</i> HT の LDH 遺伝子のクローニング	30
2-3-2 <i>Lb. acetotolerans</i> HT の LDH 遺伝子の異種発現	33
2-4 小括	37
第三章 <i>Lactobacillus acetotolerans</i> HT の D-乳酸脱水素酵素遺伝子を 導入した大腸菌組換え株による乳酸ベースコポリマーの合成	38
3-1 緒言	39
3-2 実験操作	42
3-2-1 使用した菌株およびプラスミド	42
3-2-2 組換えプラスミドの構築	42
3-2-3 共重合ポリエステルの生合成	45
3-3 結果および考察	47
3-4 小括	53

第四章 大腸菌を宿主とした新規乳酸ベースコポリマーの合成	55
4-1 緒言	56
4-2 実験操作	59
4-2-1 使用した菌株およびプラスミド	59
4-2-2 菌株の保存	59
4-2-3 組換えプラスミドの構築	59
4-2-4 共重合ポリエステルの生合成	62
4-2-5 ポリエステルの性質と物性評価	63
4-3 結果および考察	65
4-4 小括	74
第五章 総括	75
引用文献	80
Appendix	93
Appendix-1 使用培地	94
Appendix-2 protocols	97
謝辞	120

# 第一章

## 序論

## 1-1 乳酸と乳酸菌

乳酸 (lactic acid, LA) は、食品、医薬品、化学工業などの分野において幅広く利用されている。例えば、食品酸味料、防腐剤や pH 緩衝剤として、また、局所用軟膏やローションなどに利用されている<sup>1,2)</sup>。近年では、環境中の微生物によって水や二酸化炭素に分解される、いわゆる生分解性プラスチックのポリ乳酸 (Poly(lactic acid), PLA) の原料として、需要が増大している。

乳酸は、分子式： $C_3H_6O_3$ 、示性式： $CH_3CH(OH)COOH$ 、IUPAC 置換命名：2-ヒドロキシプロパン酸 (2-hydroxypropanoic acid) と表され、不斉炭素を有する最も単純なヒドロキシ酸であり、2 つの光学異性体の D(-)-乳酸および L(+)-乳酸がある。L-乳酸は、ヒトおよび他の哺乳動物において生産され、D-および L-乳酸の両方が微生物系において生産される<sup>3)</sup>。乳酸は、化学合成または乳酸発酵により製造される。化学合成では、DL-乳酸 (ラセミ体の乳酸) のみ製造されるが、乳酸発酵では、菌を選択することにより、D-乳酸、L-乳酸、DL-乳酸のいずれも製造することができる<sup>4)</sup>。乳酸発酵において、菌の増殖を考慮すると培養 pH は約 6~7 に維持することが適しているが、乳酸の酸解離定数 (pK at 25°C, D-乳酸 3.83, L-乳酸 3.79, DL-乳酸 3.86) は低いため、大部分が解離型乳酸となり、直接抽出できず、精製を行う必要がある<sup>4-6)</sup>。低い pH において乳酸発酵する必要があるが、ほとんどの微生物は、低い酸耐性のために pH 4 未満では、増殖して乳酸を産生することができない<sup>4,6)</sup>。したがって、乳酸の工業的生産において、酸耐性のある微生物を利用する必要がある。

乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) は、炭水化物を発酵し、主要な代謝産物として乳酸を産生する細菌である。乳酸菌の一般的特徴として、グラム陽性、非孢子形成、球菌または桿菌、カタラーゼ陰性、非運動性、低 pH 耐性、低 GC 細菌であることなどがあげられる<sup>7-10)</sup>。主な乳酸菌群として、*Aerococcus* 属、*Carnobacterium* 属、*Enterococcus* 属、*Lactococcus* 属、*Lactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Oenococcus* 属、*Pediococcus* 属、*Sporolactobacillus* 属、*Streptococcus* 属、*Tetragenococcus* 属、*Weissella* 属、*Vagococcus* 属などがあげられる<sup>7-9)</sup>。これらの乳酸菌の多くは、発酵食品、飲料および動物飼料の伝統的および工業的生産に関連しており、その数種は、健康促進能力を有するプロバイオティクス株として利用されている。さらに、いくつかの乳酸菌が生産する酵素や抗菌活性を有するペプチド (バクテリオシン) は、食品の風味、保存または質感に寄与する物質として利用されている。また、ほとんどの乳酸菌が、米国の FDA (Food and Drug Administration) により GRAS (Generally Recognized As Safe) とみなされ、安全性が高い<sup>8,9)</sup>。

乳酸菌は、グルコースおよびキシロース同化のための 2 つの主要な経路であるエムデン・マイヤーホフ・パルナス経路 (EMP 経路) とホスホケトラーゼ経路 (PK 経路) を有する。ホモ発酵では EMP 経路を介して、グルコース 1 mol あたり 2 mol の ATP が生成され、最終生産物として乳酸のみを産生するが、ヘテロ発酵では PK 経路を介して、1 mol のグルコースから 1 mol の ATP が生成され、乳酸以外に、エタノー

ル、ギ酸ジアセチル、酢酸および二酸化炭素の混合物を生成する<sup>6,8,11</sup>)。このような糖代謝によりエネルギーを得る過程において NAD<sup>+</sup>が補酵素として必要である。乳酸は、ピルビン酸が乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) により還元されることにより生成される。この反応において、糖代謝により生成した NADH が電子供与体として酸化される。つまり、乳酸菌が乳酸を作る最大の理由は NADH を NAD<sup>+</sup>に再生させて糖代謝を動かすためである<sup>10,12</sup>)。LDH は L 型乳酸脱水素酵素 (L-LDH: EC 1.1.1.27)、D 型乳酸脱水素酵素 (D-LDH: EC1.1.1.28) に大別され、それぞれピルビン酸から可逆反応により、L-乳酸あるいは D-乳酸を生産する。乳酸の工業生産ではホモ乳酸発酵する菌株を使用することが多く、主に L-乳酸を生産する乳酸菌は、*Lactobacillus delbrueckii*、*L. amylophilus*、*L. bavaricus*、*L. casei*、*L. maltaromicus*、*L. salivarius*、*Enterococcus faecalis*、*Streptococcus thermophilus* などがあり、*L. lactis*、*L. jensenii*、*L. acidophilus*、*Spololactobacillus inulinus* などは D-乳酸または DL-乳酸を生産する<sup>3,5,12</sup>)。発酵による L-乳酸生産技術は十分に確立されているが、D-乳酸生産についてはほとんど研究されておらず、微生物による生産性はよく知られていない<sup>6,13,14</sup>)。

## 1-2 *Lactobacillus acetotolerans* について

*Lactobacillus acetotolerans* は、最初に米酢から酢酸に対する耐性を示した乳酸菌として分離され、汚染菌として、基準株 *Lb. acetotolerans* JCM 3825 (NBI 3014) が登録されている<sup>15</sup>)。 *Lb. acetotolerans* は、日本の糠床の発酵後期において見出される<sup>16,17</sup>)。比較的熟成期間の短い糠床の細菌叢は、*Lactobacillus namurensis* などの別の乳酸菌と *Lb. acetotolerans* で構成されているが、熟成期間が長くなるとともに、*Lb. acetotolerans* を主体とする細菌叢に変化する傾向がみられる。モデル糠床におけるモニタリング実験では、*Lb. acetotolerans* は発酵開始から緩慢に増殖し続け、最終的に最優占種となった<sup>17</sup>)。発酵後期の *Lb. acetotolerans* の増殖に伴い、pH が低下することから、*Lb. acetotolerans* は、低い pH 条件でも耐性があり、乳酸生成に伴って増殖を続けることができることが示されている。しかしながら、熟成糠床からの培養分離は成功していない。糠床中の *Lb. acetotolerans* の 16S rRNA/16S rDNA の比率は他の乳酸菌に比べて低く、熟成糠床中で代謝活性を非常に低く保ちながら生育しており、難培養微生物であるとみなされた<sup>16</sup>)。

田中らは、放置中の米もろみ酢 (pH 2.9、6%酢酸) より *Lb. acetotolerans* HT の分離に成功した<sup>18</sup>)。HT 株は、最適温度 30°C を示し、10% (v/v) O<sub>2</sub> 以上では生育できない通性嫌気性細菌である。HT 株の生育可能 pH は 3.2-6.8 と広く、他の乳酸菌の増殖が著しく抑制される 2% (w/v) 酢酸 (pH 4.2) を加えた培地で比較的高い菌体量を示し、4% (w/v) 酢酸 (pH 3.8) を加えた培地でさえ、増殖を示した<sup>18</sup>)。また、HT 株はホモ DL-乳酸発酵を行い、pH 制御を行わない回分培養では、他の代表的な乳酸菌と比べて

得られる乳酸生産量 (59.5 g/L) が高い。簡易 pH 制御による回分培養の場合、L-乳酸の製造によく用いられる *Lactococcus lactis* と比べると増殖速度が遅く、そのため発酵時間が長くかかるが、得られる菌体量と乳酸生産量 (197.5 g/L) は高いことが明らかとなっている<sup>18)</sup>。また、培養において、HT 株の増殖における長い誘導期は、数種の脂肪酸を添加することにより短縮される<sup>19)</sup>。

藤らは、腐敗 (火落ち) した日本酒から *Lb. acetotolerans* RIB 9124 (NBRC 13120) を分離し、全ゲノム配列を決定した (accession number AP014808.1 in EMBL, GenBank and DDBJ)。 *Lb. acetotolerans* RIB 9124 のゲノム配列は、プラスミドを含まない 1,704,859 bp の環状染色体からなる<sup>20)</sup>。それには、1 つの D-LDH 遺伝子 (GenBank accession number: BAQ56456.1) および 2 つの L-LDH 遺伝子 (accession nos. BAQ56724.1 and BAQ57206.1) の存在が推測されている。

### 1-3 バイオプラスチック

プラスチックは今日の経済や日常生活の中で重要かつ普遍的な合成高分子材料であり、プラスチックのない日常生活は想像することも難しい。しかしながら、プラスチック系の廃棄物・散乱ごみによる環境汚染が問題になっている。プラスチックが地表、河川や海洋において散乱ごみとなると、分解されないため、環境に生息する野生動物や海洋生物が摂食し、死に至るなどの深刻な環境負荷を引き起こしている。さらに、化石資源の大量消費による地球温暖化進行の恐れ、石油資源の将来における枯渇の可能性が課題となっている。

日本において、2016 年間に生産されたプラスチックは約 1,075 万 t であり、廃棄されたプラスチックは約 899 万 t である<sup>21)</sup>。廃棄されたプラスチックの約 84% は有効利用されているが、サーマルサイクル (焼却してその熱エネルギーを利用する) として使われている比率が高く、マテリアルサイクル (素材として再利用する) として再生利用されているのは、約 23% である。さらに、ヨーロッパでは毎年 2,500 万 t のプラスチック廃棄物が発生しており、リサイクルのために回収されるのは 30% 未満である<sup>22)</sup>。2017 年、欧州委員会 (European Commission, EC) はプラスチックの製造と使用に重点を置き、2030 年までにすべてのプラスチック包装をリサイクル可能にするという目標に向かって取り組むことを発表した。このような背景から、近年、石油由来のプラスチックに代わる代替製品として、関心をあつめているのが、バイオプラスチック (bioplastics) である。

バイオプラスチックはバイオマスプラスチック (あるいは、バイオベースプラスチック, bio-based plastics) および生分解性プラスチック (biodegradable plastics) を含む<sup>6)</sup><sup>23)</sup>。バイオマスプラスチックとは、再生可能なバイオマスにより製造されるプラスチックのことであり、化石資源使用量の低減による地球温暖化防止への貢献が期待され

ている。一方、生分解性プラスチックとは、バイオマス由来または石油由来関係なく、ある一定の条件下で主に土中の微生物の働きによって水と二酸化炭素にまで分解されるプラスチック全てを指す<sup>6, 23-25)</sup>。主なバイオプラスチックにおける生分解性プラスチックとバイオマスプラスチックの相互関係を Fig. 1-1 に示す。

生分解性プラスチックの分解は以下のように二段階で起こる。第一段階は、ポリマー鎖（高分子量）からより短い鎖（低分子量）への分解である。高分子量のポリマー、とくに水に不溶性のポリマーは、微生物の細胞内に浸透しない。そのため、まず細胞外において、微生物の細胞外酵素（分解酵素）による反応や光や温度による非生物学的反応により、ポリマー鎖は切断される。微生物の分解酵素は、材料表面に結合し、表面のポリマー鎖を加水分解によって切断して低分子量化合物（有機酸、糖など）を生成する。第二段階においては、生成された低分子量化合物が微生物の菌体内に取り込まれ、さまざまな代謝経路を経て、各種の生体物質の合成やエネルギー生産に用いられ、好気的環境下では二酸化炭素に変換される。海水、湖水、土中などの自然環境中において、このような働きをする多種多様な微生物が存在している<sup>23, 24, 26, 27)</sup>。生分解性プラスチックの持つメリットとして、自然環境中で使用される製品や使用後のリサイクルが難しい分野に使用できることや、焼却した場合にも燃焼熱が石油系プラスチックと比べて低いため焼却炉を傷つけることなく、クリーンで大気を汚さないことがあげられる<sup>24, 28)</sup>。

生分解性プラスチックとして研究の対象となっている高分子物質は主に、①微生物生産系：糖などを原料として微生物（細菌やカビ、藻類など）の体内に蓄積させるタイプ、②天然物系：デンプンや酢酸セルロース、あるいはキトサンのような植物系、あるいは動物系生物資源（バイオマス）を利用したタイプ、③化学合成系：モノマーと呼ばれる化学物質を重合するタイプに分類される<sup>25, 26)</sup>。国内で展開されている主な生分解性プラスチックの分類と性質を Table 1-1 に示す<sup>29)</sup>。

日本バイオプラスチック協会（Japan BioPrastics Association, JBPA）では、一般消費者が、バイオプラスチック製品を容易に識別できるよう、バイオプラスチックに関する識別表示制度を運用して二つの認証事業（バイオマスプラおよびグリーンプラ）を行っている。バイオマスプラ認証表示制度は、有機資源（植物等）由来物質を、プラスチック構成成分として所定量以上含むなど JBPA が定めた基準に適合する製品を「バイオマスプラ」として認証し、シンボルマークの使用を許可する制度である（Fig. 1-2）。グリーンプラ識別表示制度は、生分解するプラスチック製品の中でも JBPA による生分解性の基準と、環境適合性の審査基準を満たした製品に「グリーンプラ」のマークと名称の使用を認める制度である（Fig. 1-2）。



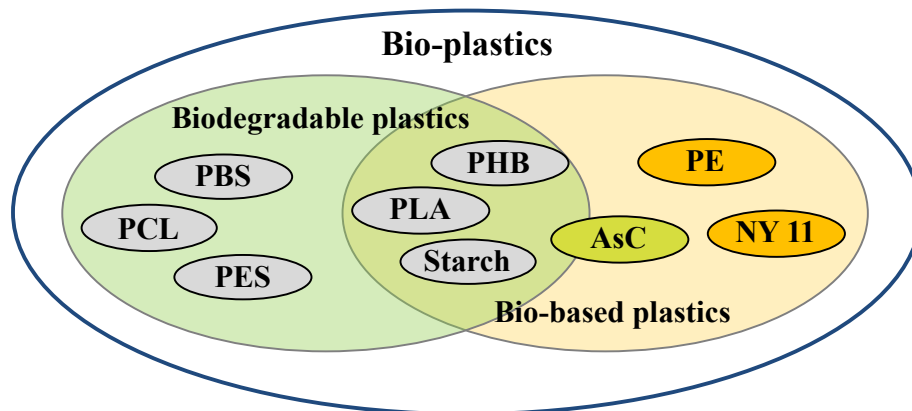


Fig. 1-1 生分解性プラスチックとバイオマスプラスチックの相互関係<sup>23)</sup>  
 PBS, poly(butylene succinate); PCL, polycaprolactone; PES, poly(ethylene succinate); PHB, poly(hydroxybutyrate); PLA, poly(lactic acid); PE, polyethylene; NY 11, Nylon 11; AsC, acetyl cellulose



Fig. 1-2 バイオマスプラおよびグリーンプラのマーク<sup>29)</sup>

Table 1-1 国内で使用されている生分解性プラスチック 29)

分類	高分子名称	略称	特質	コメント
微生物系	ポリヒドロキシブチレート	PHB	H	硬い
	ポリ (ヒドロキシブチレート/ヒドロキシヘキサノエート)	PHBH	H~S	硬~軟
天然物系	エステル化澱粉		H~S	硬~軟
	酢酸セルロース	CA	H	硬い
	キトサン/セルロース/澱粉		H	硬い
	澱粉/化学合成系グリーンプラ		H~S	硬~軟
化学合成系	ポリ乳酸	PLA	H	硬い
	(ポリ乳酸/ポリブチレンサクシネート系) ブロックコポリマー	PLA-co-PHB	H~S	硬~軟
	ポリカプロラクトン	PCL	S	ポリエチレンフィルムのように軟らかい
	ポリ (カプロラクトン/ブチレンサクシネート)	PCLBS		
	ポリブチレンサクシネート	PBS		
	ポリ (ブチレンサクシネート/アジペート)	PBSA		
	ポリ (ブチレンサクシネート/カーボネート)	PEC		
	ポリ (エチレンテレフタレート/サクシネート)	PETS	H	PET や
	ポリ (ブチレンアジペート/テレフタレート)	PBAT	S	PBT を生分解性に 変性
	ポリ (テトラメチレンアジペート/テレフタレート)	PTMAT		
	ポリエチレンサクシネート	PES		
	ポリビニルアルコール	PVA	H	硬い
	ポリグリコール酸	PGA	S	軟らかい

\*樹脂の基本的な特性：H=硬質樹脂（ガラス転移点>室温）、S=軟質樹脂（ガラス転移点<室温）

■: ジオール・ジカルボン酸系（いずれも LLDPE~PP~PET 類似軟質系）

LLDPE, 直鎖状低密度ポリエチレン; PP, ポリプロピレン; PET, ポリエチレンテレフタレート

## 1-4 ポリ乳酸

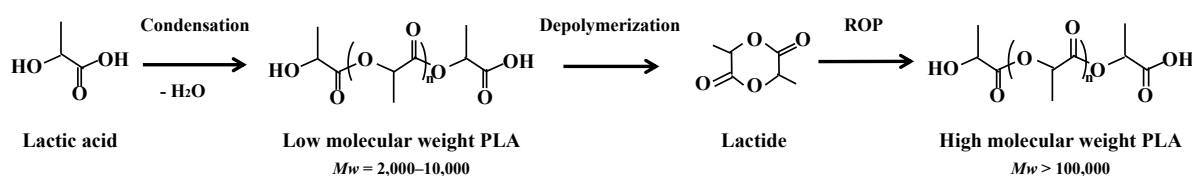
ポリ乳酸 (poly(lactic acid), PLA) は、 $\alpha$ -ヒドロキシ酸である乳酸が重縮合した生分解性プラスチックの一つであり、脂肪族ポリエステルに属する<sup>3)</sup>。PLA はバイオマスから人工的に合成されるバイオプラスチックでもあり、天然には存在しない。PLA の合成は、1932 年において、Carothers らにより初めて試みられた<sup>27, 30, 31)</sup>。1960 年代、PLA は医療や製薬分野で生体吸収性材料としての使用を見出され、1980 年代後半以降からは、プラスチック廃棄物の環境問題を背景に国民の関心を引いている<sup>27, 31)</sup>。現在、PLA は、繊維製品からボトルや包装容器まで、幅広い用途に使用されており、その生産量は、2014 年では約 20 万 t、2020 年までに約 45 万 t に達すると予測されている<sup>32)</sup>。

一般的に、PLA の製造方法は、直接法とラクチド法がある<sup>33, 34)</sup>。Lowe らは、今日における PLA 製造法の主流であるラクチド法を発明した<sup>35)</sup>。ラクチド法は、デンプンの発酵法により得られる乳酸を原料として、乳酸の環状二量体であるラクチドを経由した化学重合により合成する方法である。平均分子量が約 1 万以下の低重合体は、乳酸の脱水重縮合によって容易に合成できるが、高重合体となると、乳酸オリゴマーの熱分解によって得られたラクチドの開環重合 (ring-open polymerization, ROP) によらなければ難しい。Figure 1-3 にラクチド法について示す。乳酸水溶液を 5~20 mmHg 程度の減圧下で 200°C 付近に加熱して脱水縮合を促進することにより分子量数万程度の PLA ( $M_w = 2,000-10,000$ ) を得ることができる。それにアルミニウムイソプロポキシド ( $\text{Al}(\text{OiPr})_3$ )、オクチル酸スズ ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ) や  $\text{Zn}^{2+}$  系の重金属、ランタニド系 ( $\text{Y}(\text{OiPr})_3$ ) などの触媒を加えて、200°C 以上の温度で 1~5 mmHg 程度の減圧下で解重合させラクチドを合成する。さらにラクチドの合成に用いたものと同じ触媒とともに減圧下で封管し、融点以上の温度で開環重合させ、高分子の PLA ( $M_w > 100,000$ ) を合成する<sup>3, 33, 36, 37)</sup>。一方、直接法はラクチドを経由せずに、乳酸から直接縮合により一段階でエステル化して PLA を合成する方法である。長い間、このプロセスは不可能と考えられていたが、最近、直接法による高分子 PLA 合成の研究が進められている<sup>3, 33, 37-41)</sup>。

前述したように、乳酸には 2 つの光学異性体の D-乳酸 (D-LA) および L-乳酸 (L-LA) が存在し、D-LA を単位とする高分子をポリ-D-乳酸 (PDLA)、L-LA を単位とする高分子をポリ-L-乳酸 (PLLA)、D-LA と L-LA がランダムに結合したものをポリ-DL-乳酸 (PDLLA) と呼ぶ。これらの性質は異なり、PDLA と PLLA の融点 ( $T_m$ ) は約 170-180°C、ガラス転移点 ( $T_g$ ) は約 55-80°C であるが、PDLLA は  $T_g$  59°C を有する非晶性のポリマーである<sup>3, 27, 33)</sup>。さらに、PDLA と PLLA を 1:1 で混合したものをステレオコンプレックス (stereocomplex, SC) PLA と呼ぶ。この SC-PLA は左巻きらせん鎖の PLLA と右巻きのらせん鎖の PDLA が隣り合って充填された構造をとると考えられており、より高い  $T_m$  (220~230°C) を示すため、高強度材料として注目されている<sup>33, 34, 42-45)</sup>。したがって、D-あるいは L-乳酸を選択的に製造することが求められている。

脂肪族ポリエステルは、それを組み立てているエステル結合が微生物の生産する酵素によって分解されるが、PLA を分解する微生物は広く分布していない。つまり、土

壤中の PLA の分解は遅く、分解が始まるまでに長い時間がかかる<sup>23,24)</sup>。PLLA と PDLA は異なる酵素によって分解されることが知られており、PLLA は特定のプロテアーゼ、リパーゼおよびクチナーゼ様タンパク質によって分解される<sup>23, 24, 31, 46)</sup>。一方、PDLA を分解する酵素は少なく、これまでにクチナーゼ様酵素によって分解されることが報告されている<sup>31,46)</sup>。



**Fig. 1-3** ラクチドの合成及びその開環重合によるポリ乳酸の合成<sup>3, 33, 36, 37)</sup>

## 1-5 ポリヒドロキシアルカン酸

自然界に存在する多くの微生物は、植物がデンプンを貯蔵炭水化物として蓄積し、動物がグリコーゲンや脂肪を蓄積するのと同じように、ポリヒドロキシアルカン酸 (polyhydroxyalkanoate, PHA) と呼ばれるポリエステルをエネルギー貯蔵物質として菌体内に蓄積する (Fig. 1-4)<sup>47-50)</sup>。1920 年代に仏パスツール研究所の Lemoigne により *Bacillus megaterium* から主要な PHA であるポリ-(R)-3-ヒドロキシブタン酸 (Poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB)) は発見された<sup>51)</sup>。その後、PHA はすぐには積極的な基礎・応用研究の対象とならなかったが、1960 年代に入ると、発酵合成をはじめ、構造、物性や分解性に関する多くの研究が報告されるとともに、1980 年代にはそれらを主成分とするポリマーの商業生産が開始された<sup>50,52)</sup>。今日では、グラム陰性、陽性の好気性細菌、光合成細菌、嫌気性細菌など多くの細菌において PHA が合成されることが報告されており、石油由来のプラスチックと同じく熱可塑性を示し、かつ比較的容易に生分解されることから環境低負荷型プラスチックとして期待されている<sup>53-55)</sup>。

PHA はそれを構成するモノマーの鎖長により、3 つに分類される。炭素数 3~5 の短鎖長 (short-chain-length) の (R)-3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) からなる SCL-PHA、炭素数 6~14 の中鎖長 (medium-chain-length) の 3HA をモノマーユニットとする MCL-PHA、さらに SCL と MCL の 3HA の両方をモノマーユニットとする SCL-MCL-PHA である (Fig. 1-5)<sup>49,56)</sup>。SCL-PHA の代表的なものに、炭素数 4 の (R)-3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) をモノマー単位とする P(3HB)があげられ、*Cupriavidus necator* (旧名 *Ralstonia eutropha*) のような広範囲の細菌によって合成される。MCL-PHA のポリ-(R)-3-ヒドロキシアルカン酸 (Poly(3-hydroxyalkanoate), P(3HA)) は、主に、*Pseudomonas* 属

細菌により合成される<sup>50, 52</sup>)。これらの PHA のモノマー組成は、合成に使用される炭素源や基質供給経路、さらには、PHA 重合酵素の基質特異性に関係する。

PHA 生合成において、主に 3 つの合成経路がよく知られている (Fig. 1-6)<sup>52, 55</sup>)。Pathway I は糖から SCL-PHA を生合成する経路である。この経路は、*C. necator*、*Aeromonas hydrophila*、または *Pseudomonas stutzeri* に見られ、特に *C. necator* による P(3HB)の合成がよく知られている。菌体内に取り込まれた糖 (グルコースやフルクトースなど) はアセチル CoA へと代謝される。このアセチル CoA が  $\beta$ -ケトチオラーゼ ( $\beta$ -ketothiolase, PhaA) の働きにより二量化されてアセトアセチル CoA となり、続いて NADPH 依存性のアセトアセチル CoA リダクターゼ (NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase, PhaB) により還元されて (R)-3-ヒドロキシブチリル CoA ((R)-3HB-CoA) となる。これをモノマーとして PHA 重合酵素 (PHA synthase, PhaC) が P(3HB)へと重合する。Pathway II と III は MCL-PHA の合成に関わる経路である。Pathway II では、脂肪酸から  $\beta$ 酸化を介して (R)-3-ヒドロキシアシル CoA ((R)-3HA-CoA) を生成する。この経路の完全な解明には至っていないが、これまでに *Aeromonas caviae* では、脂肪酸  $\beta$ 酸化系の中間体であるエノイル CoA から (R)体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ ((R)-specific enoyl-CoA hydratase, PhaJ) によって (R)-3HA-CoA が供給されることがわかっている<sup>57, 58</sup>)。また、*Pseudomonas* 属細菌や *C. necator* でも *phaJ* 遺伝子が発見されており、PhaJ が有力なモノマー供給系酵素であると考えられている<sup>59-62</sup>)。Pathway II では、基質となる脂肪酸が分解され、それによりモノマー組成が決定するが、Pathway III では、モノマー構造と無関係な炭素源 (グルコース、スクロースおよびフルクトースなど) から脂肪酸合成経路を介して (R)-3HA-CoA を生成する。この経路では、生成されたアセチル CoA がアセチル CoA カルボキシラーゼによってマロニル CoA となる。次に、ACP マロニルトランスフェラーゼにより、CoA がアシルキャリアタンパク質 (ACP) に置き換わり、マロニル ACP となる。さらに、*de novo* 脂肪酸合成経路を経て、(R)-3HA-ACP となる。そして、3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ (PhaG) の作用により、(R)-3HA-CoA となる<sup>63-66</sup>)。PhaG は最初 3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼであると報告され、3-ヒドロキシアシル基を ACP 部分から CoA 部分に転移すると考えられていた。しかしながら、Wang らにより実際には 3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼとして機能していることが近年報告された<sup>67</sup>)。したがって、脂肪酸合成経路を介して (R)-3HA-CoA を生成するためには、(R)-3HA-CoA リガーゼが必要であると考えられる。これまでに、*Pseudomonas putida* KT2440 および *P. aeruginosa* PAO1 において、(R)-3HA-CoA リガーゼ活性があるタンパク質をコードする遺伝子が同定されている<sup>67, 68</sup>)。

PHA 重合酵素の基質特異性は、PHA のモノマー組成に関係する<sup>50, 69</sup>)。例えば、*C. necator* の PhaC は短鎖長の 3HA-CoA、特に、(R)-3HB-CoA に特異的であり、糖を炭素源として培養すると、SCL-PHA の P(3HB)ホモポリマーを合成する。一方で、*Pseudomonas oleovorans* や *P. aeruginosa* の PHA 重合酵素は、中鎖長の (R)-3HA-CoA に特異的であり、MCL-PHA の P(3HA)コポリマーを合成する<sup>70, 71</sup>)。また、*Pseudomonas*

sp. 61-3 の PhaC1 は、基質特異性が低いことから、炭素数 4~12 までの幅広いモノマーを取り込むことができ、SCL-MCL-PHA の P(3HB-co-3HA) を合成する<sup>72)</sup>。

PHA の性質は、モノマー組成により異なり、SCL-PHA の P(3HB) ホモポリマーは、硬くて脆い性質を有し、一方、炭素数 6~14 の MCL-PHA の P(3HA) コポリマーはアモルファス状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言えない<sup>73, 74)</sup>。SCL-MCL-PHA は、SCL と MCL の分率比に応じて広範囲な性質を示す。例えば、*Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株が合成した P(94% 3HB-co-6% 3HA) は、低密度ポリエチレン (LDPE) と同等の柔軟性を示す<sup>75)</sup>。

大腸菌は非 PHA 生産菌であるが、増殖が速く、遺伝学的・生化学的性質も明らかになっているため、PHA を生産するための宿主として利用されてきた。これまでに、大腸菌を宿主とした SCL-PHA、MCL-PHA および SCL-MCL-PHA の生産に関する多数の研究がある<sup>76)</sup>。Schubert らは *C. necator* 由来の *phaA*、*phaB* および *phaC* 遺伝子を導入した大腸菌により P(3HB) を合成した<sup>77)</sup>。また、大腸菌を宿主にし、PhaA、PhaB、PhaC および PhaJ を共発現させることにより、グリセロールとドデカン酸の混合物から  $\beta$  酸化経路を介して炭素数 4~10 のさまざまなモノマー組成からなる P(3HB-co-3HA) が合成されている<sup>78)</sup>。さらに最近では、PhaA、PhaB、PhaC、PhaG および (R)-3HA-CoA リガーゼを共発現させ、安価なグルコースを炭素源とした P(3HB-co-3HA) の合成に成功している<sup>68, 79)</sup>。

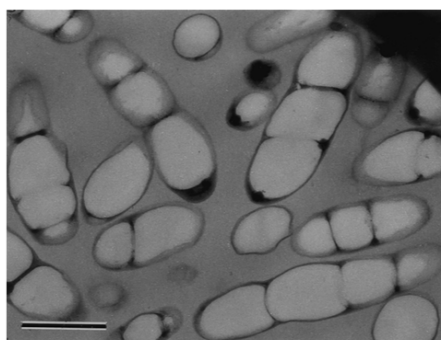
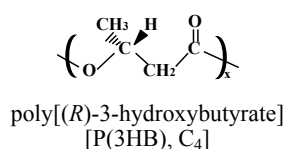
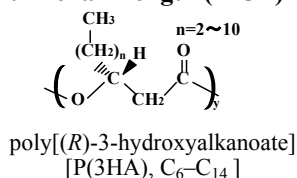


Fig. 1-4 PHA を蓄積した微生物の電子顕微鏡写真<sup>50)</sup>

#### short-chain-length (SCL)-PHA



#### medium-chain-length (MCL)-PHA



#### SCL-MCL-PHAs

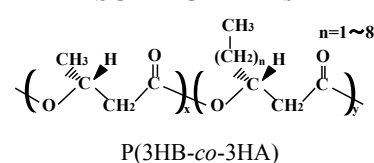


Fig. 1-5 PHA の分類

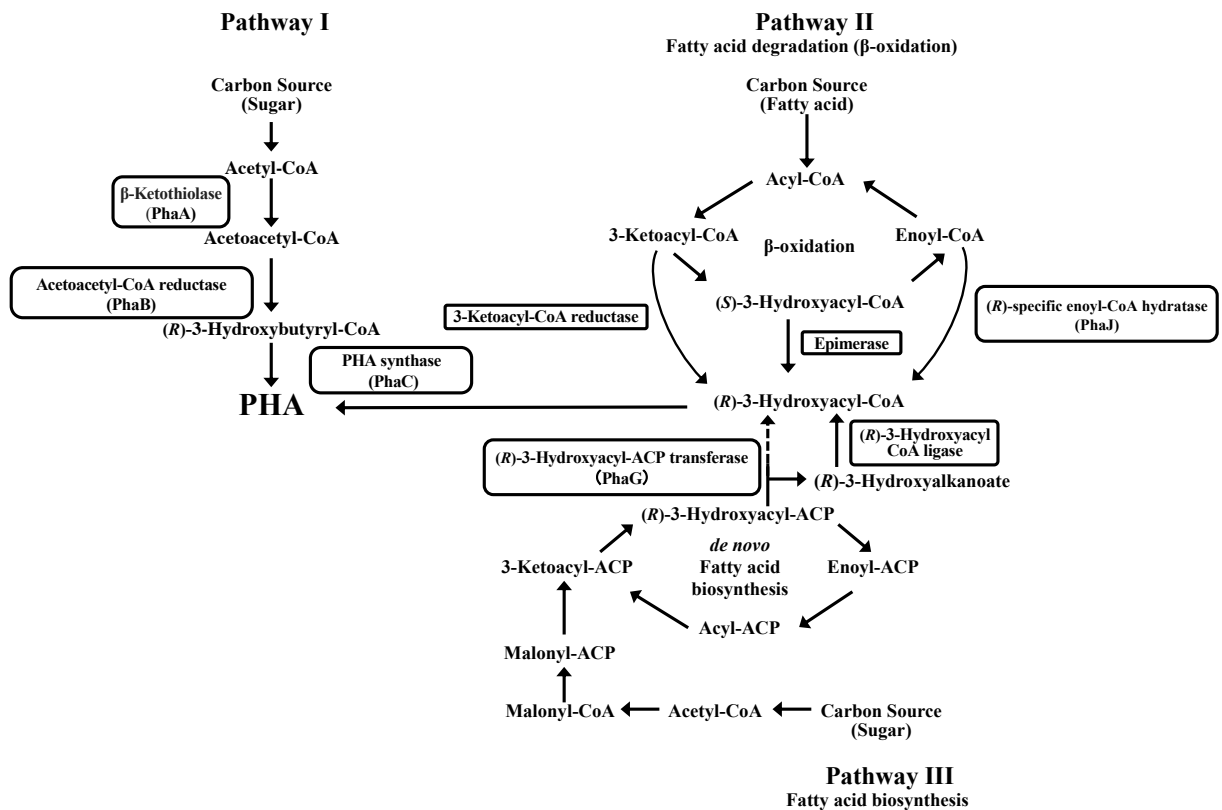


Fig. 1-6 PHA の合成経路 52, 55)

## 1-6 乳酸ベースポリマーについて

PLA は、頑丈で、高い透明性を有するため、バイオベースプラスチックの中で最も使用されている。前述したように PLA は通常、微生物による発酵後、重金属を触媒とした化学重合により製造される<sup>3)</sup>。近年、PHA 生合成システムを利用した PLA 様ポリマー(乳酸ベースポリマー)の合成が検討されている。PLA のモノマーである乳酸(LA)の化学構造は 3HB と類似しているが、これまで知られている PHA 重合酵素では D-lactyl-CoA (D-LA-CoA) は重合されない。そこで、D-LA-CoA を重合できるように人工的に改変させた PHA 重合酵素 (LA-polymerizing enzyme, LPE) についての研究が行われている (Fig. 1-7)<sup>80,81)</sup>。2003 年、高瀬らは、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の低基質特異性 PHA 重合酵素 (PhaC1) の 325 番目のセリンをスレオニンに、481 番目のグルタミンをリシンに改変させた酵素 PhaC1(STQK)を作製した<sup>82)</sup>。さらに、その酵素と、D-LA に CoA を付与する *Megasphaera elsdenii* 由来のプロピオニル CoA トランスフェラーゼ (propionyl-CoA transferase, PCT)、3HB-CoA を供給する *C. necator* 由来の PhaA および PhaB を用いて大腸菌を宿主とした乳酸ベースポリマー P(LA-co-3HB)の生合成について報告している<sup>83)</sup>。このときの LA 分率は 6 mol%であり、これが、LA ユニットを含

むポリマーを合成した最初の例となった。

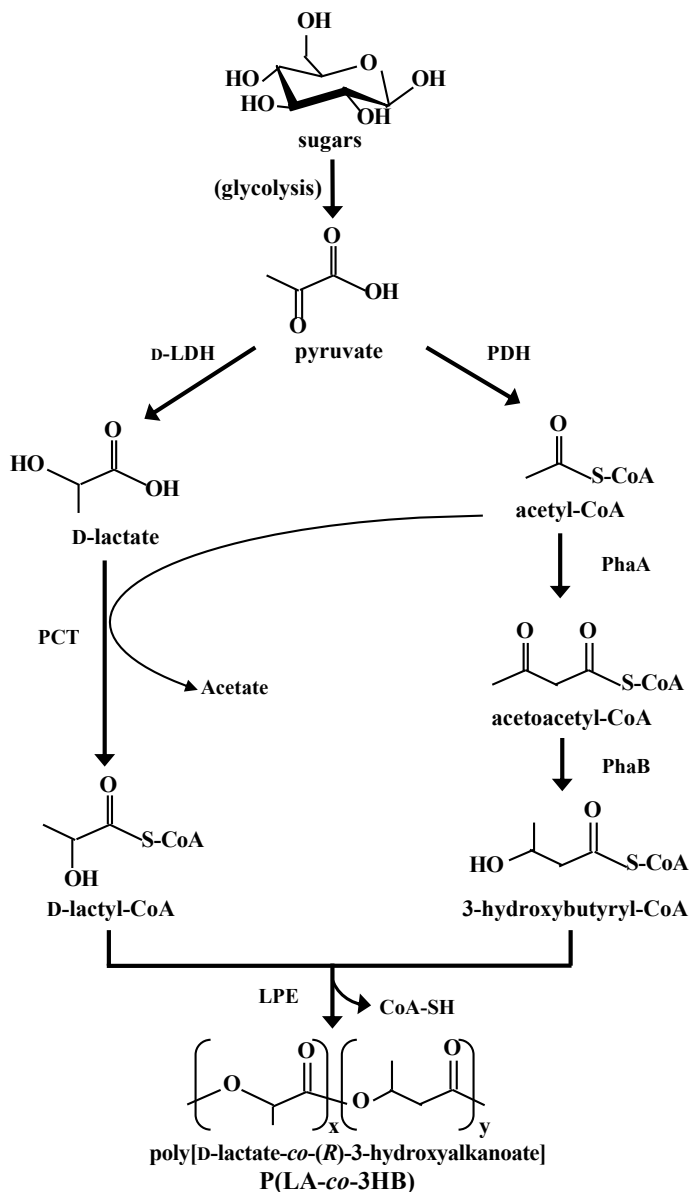
山田らは、ジャーファメンターを用いて窒素通気による嫌気培養を行うことにより 4~47 mol%の LA 分率からなるさまざまな P(LA-co-3HB)を生合成し、これらのソルベントキャストフィルムを作製した<sup>84)</sup>。その結果、LA 分率 15 mol%以上の P(LA-co-3HB)フィルムは P(3HB)フィルムと比べて透明であり、LA 分率を向上させると透明性が高まることを示した。したがって、LA 分率を高めるため、宿主や炭素源の検討、酵素変異体の作製、代謝制御など、さまざまな試みが行われている<sup>81,85-88)</sup>。例えば、ギ酸の生成経路を遮断することにより、LA の生産を高めるように代謝改変した大腸菌 (*pflA* knockout mutant) を宿主に用い、LA 分率を向上させたことが報告されている<sup>81,84,85)</sup>。正瑞らは、吉草酸を培地に添加することにより、3HB ユニット、3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) ユニット、さらに 96 mol%の LA ユニットを含む P(96 mol% LA-co-3HB-co-3HV)を合成させた<sup>86)</sup>。また、Song らは、LPE を発現する組換え *Corynebacterium glutamicum* を用いた培養で 99 mol%以上の LA を含むポリマーの合成に成功している<sup>87)</sup>。このように、最初に改変 PHA 重合酵素 (LPE) を作製して以来、LA 分率を高める試みが行われている。LPE を利用した研究において LA 分率を高めることは可能だが、LA 分率 100%のホモポリマーを合成することは成功していない。そのため、LPE は(R)-3-ヒドロキシブチリル-CoA の共存下により、D-LA-CoA を重合すると考えられていた<sup>80,81)</sup>。最近、松本ら<sup>89)</sup>の *in vitro* アッセイの研究により、LPE である PhaC1(STQK) は D-LA-CoA を唯一の基質として重合したが、基質が完全に消費される前に重合反応が停止したことが報告されている。この反応生成物は、分子量 1500~3000 の LA のみからなるポリマーであった。このことから、PLA ホモポリマーを合成できない要因は、低分子量 PLA 生成後の PhaC1(STQK)の酵素反応の停止によるものであると推測されている。PLA ホモポリマーを合成することは困難であるが、LA 分率を高めることにより、PLA と似た透明性を有するポリエステルを合成することはできる<sup>84)</sup>。つまり、微生物菌体内の共重合ポリエステルにおいて、その LA 分率を高めることで PLA と同等のポリマーを合成することである。

PLA は透明性を有するが、硬質のプラスチックであり、柔軟性に欠ける。この課題を解決するために、LA と 3HB モノマーに加え、第 3 のモノマーからなる乳酸ベースポリマーの合成が検討されている。正瑞らは、グルコースに加え、3HV の前駆体としてプロピオン酸を添加することにより、大腸菌 JW0885 を宿主とした乳酸ベースターポリマー (三元共重合体) の P(LA-co-3HB-co-3HV)の合成に成功している<sup>90)</sup>。PhaC1(STQK)、PCT および PhaJ を共発現させた組換え大腸菌 LS5218 は、グルコースとブタン酸から  $\beta$  酸化経路とその逆反応を介して LA、3HB および 3 ヒドロキシヘキサ酸 (3HHx) ユニットからなる P(LA-co-3HB-co-3HHx)s を合成する<sup>91)</sup>。これらの新規な乳酸ベースポリマーは、材料に新しい性質を付与し、その用途を拡大すると期待されてきた。しかしながら、さまざまなモノマー組成を有する乳酸ベースポリマーについての報告は少ない。

前述したように、PLA を分解する微生物は少ない<sup>23, 24, 31)</sup>。一方で、PHA を分解す



る微生物は自然環境中に広く存在しており、PLA と構造が類似している P(3HB)は、P(3HB)デポリメラーゼにより分解される<sup>23,24)</sup>。Sun ら<sup>92)</sup>は、土壌中から高 LA 分率の P(67% LA-co-3HB)を分解する *Variovorax* sp. C34 を単離し、PHA デポリメラーゼ (PhaZ<sub>Vs</sub>) を同定した。さらに、PhaZ<sub>Vs</sub> は、PDLA ホモポリマーは分解しないが、P(LA-co-3HB) または PDLA オリゴマーは分解できることが示されている<sup>46)</sup>。したがって、乳酸ベースポリマーは、分解という面においても有用なポリマーであると期待される。



**Fig. 1-7 乳酸ベースポリマーP(LA-co-3HB)の合成経路**

LPE, Lactate-polymerizing enzyme; D-LDH, D-lactate dehydrogenase; PDH, pyruvate dehydrogenase complex; PCT, propionyl-CoA transferase; PhaA,  $\beta$ -ketothiolase; PhaB, acetoacetyl-CoA reductase; PhaC, PHA synthase.

## 1-7 本研究の目的

乳酸は、食品、医薬品、化学工業などの分野において幅広く利用されており、近年は、生分解性プラスチックの PLA の原料として、需要が増大している。乳酸発酵の問題点として、最終生産物である乳酸の阻害により菌体増殖速度と乳酸生産速度が発酵中に急激に低下することが挙げられる。そのため、乳酸発酵において、乳酸の阻害を受けにくい菌が望ましいと考えられる。さらに、PDLA と PLLA が 1:1 で混合した SC-PLA は耐熱性が高まることから、D-あるいはL-乳酸を選択的に製造することが求められている。しかしながら、D-乳酸生産に利用できる菌は少ない。*Lactobacillus acetotolerans* は、厳しい酸性下でも生育できる菌であるが、この性質に関する研究報告はほとんどなく、乳酸を生成する上で最も重要である LDH に関する研究はない。そこで、本研究では、DL-乳酸を生産する耐酸性乳酸菌 *Lb. acetotolerans* HT に着目し、D-およびL-LDH のクローニングと同定を行った。

生分解性プラスチックである PLA や PHA は、モノマーがバイオベースであり、工業的な規模での生産も行われているが、これらの材料は、石油由来材料と比べ、その性能差が課題となり、汎用化には至っていない。この課題を解決するために有用な機能性をもつ生分解性プラスチックを開発する必要がある。近年、微生物菌体内での乳酸ユニットを含む生分解性プラスチック（乳酸ベースポリマー）の生合成が検討されている。この製造方法では、有害な重金属を利用せずに、生分解性プラスチックが一段階で合成できる。この研究の発展により、PLA と性質の似た生分解性プラスチックの汎用化が可能であると考えられる。そこで、本研究では、*Lb. acetotolerans* HT の D-LDH 遺伝子 (*ldhD*) を利用し、大腸菌を宿主として乳酸ベースポリマーを合成することを目的とした。

第一章では、本研究のキーワードである、乳酸や耐酸性乳酸菌の *Lb. acetotolerans*、生分解性プラスチックであるポリ乳酸やポリヒドロキシアルカン酸、乳酸ベースポリマーの最近の研究について概説した。

第二章では、耐酸性乳酸菌 *Lb. acetotolerans* HT の LDH に着目した。*Lb. acetotolerans* JCM 3825 株および RIB 9124 株のゲノム情報により、HT 株は 1 つの D-LDH 遺伝子および 2 つの L-LDH 遺伝子を有すると推測されたため、D-LDH、L-LDH1 および L-LDH2 の遺伝子 (*ldhD*、*ldhL1* および *ldhL2*) のクローニングと同定を行うことを目的とした。

第三章では、クローニングした HT 株の *ldhD* 遺伝子を利用して、乳酸ベースポリマーの合成を試みた。まず、LA と炭素数 4 の 3HB ユニットからなる P(LA-co-3HB) の合成を検討した。LA 分率を向上させると P(LA-co-3HB) フィルムは透明性が高まることが知られている<sup>84)</sup>。したがって、LA 分率を高めた乳酸ベースポリマーを合成することを目的とした。

第四章では、実用的な性能を有する乳酸ベースポリマーの合成を目指した。中鎖長 3HA を 6 mol% 含む P(3HB-co-3HA) は、LDPE と同様の柔軟性を示すことが知られている<sup>75)</sup>。これまでに、グルコースを唯一の炭素源とし、大腸菌を宿主とした P(3HB-co-

3HA)共重合ポリエステル<sup>68,79)</sup>の合成に成功している。そこで、グルコースを炭素源とし、LA および 3HB ユニット、そして中鎖長 3HA ユニットからなる新規乳酸ベースポリマーP(LA-co-3HB-co-3HA)および P(LA-co-3HA)を合成することを目的とした。

第五章では、本論文で得られた結果を総括する。

## 第二章

耐酸性乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* HT の  
乳酸脱水素酵素遺伝子のクローニングと同定

## 2-1 緒言

乳酸菌が生産する乳酸は、生分解性プラスチックの一つであるポリ乳酸 (PLA) の原料として用いられることや、食品添加物、医薬品および化粧品での利用などさまざまな分野で利用されている。乳酸の生産において、生産効率を高くするため、乳酸の発酵濃度を高める必要があるとされている。従来の乳酸発酵では、生成した乳酸によって発酵液中の pH が低下すると微生物の増殖が阻害されるため、炭酸カルシウムや水酸化カルシウムなどで中和しながら発酵を進め、得られた乳酸カルシウムから硫酸を用いて乳酸を遊離させる。この工程では、多量の硫酸カルシウムが副産物として生産されるため、乳酸発酵液の非解離型乳酸を直接あるいはエステル化法などにより、抽出する方法が試みられている<sup>6, 93)</sup>。乳酸発酵において、直接抽出できる非解離型の乳酸を多く生産するために、乳酸の pKa (約 3.78) より低い pH で培養することが理想的であるが、ほとんどの微生物は、pH 4 未満では増殖できず乳酸を生産することができない<sup>4, 6)</sup>。乳酸の工業的生産において、酸に耐性のある微生物を利用することが望ましい。さらに、ステレオコンプレックス PLA (SC-PLA) は耐熱性が高まることから、D-あるいはL-乳酸を選択的に製造することが求められているが、D-乳酸生産に利用できる菌は少ない。第一章で述べたように、*Lactobacillus acetotolerans* HT (JCM 33214) は pH 2.9 の酸性条件下でも生育可能な耐酸性乳酸菌であり、ホモ DL-乳酸発酵を行う<sup>18)</sup>。しかしながら、HT 株に限らず *Lb. acetotolerans* の研究報告はほとんどない。そこで本章では、乳酸を生成する上で最も重要な乳酸脱水素酵素 (LDH) に着目し、その遺伝子をクローニング、同定することを目的とした。*Lb. acetotolerans* JCM3825 株および RIB 9124 (NBRC 13120) 株のゲノム情報から、HT 株は1つの D-LDH 遺伝子および2つの L-LDH 遺伝子を有すると推測されているため、HT 株の D-LDH、L-LDH1 および L-LDH2 遺伝子 (*ldhD*、*ldhL1* および *ldhL2*) をクローニングし、その機能解明を試みた。これにより、HT 株において L-LDH 遺伝子を破壊し、D-乳酸を多量に生産させる変異株の作製や、HT 株の D-LDH 遺伝子を利用した乳酸ベースコポリマーを生合成させる研究へと展開できる。さらに、HT 株は耐酸性であることから、将来的に乳酸ベースコポリマー生合成における宿主候補である。したがって、HT 株の LDH 遺伝子を解明することは非常に有意義である。

## 2-2 実験操作

### 2-2-1 使用した菌株およびプラスミド

以下の菌株およびプラスミドを用いて研究を行った (Table 2-1)。

**Table 2-1 Strains and plasmids used in this study**

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
Strains		
<i>Lactobacillus acetotolerans</i> HT	Wild strain	JCM 33214, 18)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Host for cloning and plasmid propagation, <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ( $\text{trk}^{\text{m}}\text{mk}^{\text{+}}$ ), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(\text{lacZYA-argFV169})$ , $\Phi 80\Delta\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ , F-	Clontech
Plasmids		
pT7Blue T vector	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap <sup>r</sup> , <i>lacPOZ</i> , T7 promoter	Novagen
T-vector pMD20	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap <sup>r</sup> , <i>lacPOZ</i> , SP promoter	TaKaRa
pUC118 <i>HincII</i> /BAP	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap <sup>r</sup> , <i>lac POZ</i> , <i>lac</i> promoter	TaKaRa
pBluescript II KS <sup>+</sup>	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap <sup>r</sup> , <i>lacPOZ</i> , T7 and T3 promoter	Stratagene
pBS- <i>ldhD</i>	pBluescript II KS <sup>+</sup> derivative; <i>ldhD</i> gene of <i>Lb. acetotolerans</i> HT	This study
pBS- <i>ldhL1</i>	pBluescript II KS <sup>+</sup> derivative; <i>ldhL1</i> gene of <i>Lb. acetotolerans</i> HT	This study
pBS- <i>ldhL2</i>	pBluescript II KS <sup>+</sup> derivative; <i>ldhL2</i> gene of <i>Lb. acetotolerans</i> HT	This study

Ap<sup>r</sup>, ampicillin resistance gene

### 2-2-2 菌株の保存

菌株の保存には、復元が容易な凍結保存法を用いた。*E. coli* では、菌体が生育している LB 寒天平板培地 (必要に応じて抗生物質含有) から、単コロニーを液体培地に植菌し、最適温度で 12~18 時間振とう培養 (120~150 strokes/min) を行った。その培養液に、保護分散媒として 60%グリセロール水溶液 (オートクレーブ殺菌済み) を 3:1 の割合で加え (終濃度 15%グリセロール水溶液)、セラムチューブ (滅菌済み) に 0.5 mL ずつ分注し、-25°C で保存した。また、菌株を長期保存する場合は-80°C で保存を行った。*Lb. acetotolerans* HT は 1% (v/v) 酢酸含有 MRS 液体培地で 30°C、72 h 静置培養を行った培養液に上記と同様の処理を行った。

実験期間中の短期の保存には、*E. coli* では、菌体が生育している寒天平板培地から単コロニーを寒天平板培地に植菌後、最適温度で 12~36 時間培養を行い、4°C で保存し、3 週間毎に植え継ぎを行った。*Lb. acetotolerans* HT では 1% (v/v) 酢酸含有 MRS 液体培地で 30°C、72 h 静置培養後、4°C で保存し 2 週間を目安に新しい培地に植え継いだ。詳細を Appendix-2 に示す。

### 2-2-3 D-lactate dehydrogenase 遺伝子 (*ldhD*) のクローニング

既法<sup>94-97)</sup>を改変し、*Lb. acetotolerans* HT のゲノム DNA を調製した (Appendix-2 参照)。使用したプライマーを Table 2-2 に示す。

さまざまな乳酸菌の D-LDH 保存領域に基づいてプライマー、D-LDH-f1 および D-LDH-r1 (Table 2-2) を設計した。調製した *Lb. acetotolerans* HT ゲノム DNA を鋳型にして、*ldhD* 遺伝子の内部を Ex Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて degenerate PCR (Polymerase Chain Reaction ; ポリメラーゼ連鎖反応) を行った (Tables 2-3 and 2-4)。アガロースゲル電気泳動 (0.8%、100 V、30 min) を行い、得られた約 0.5-kb の増幅産物をゲルから切り出し、QIAGEN II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製後、pT7Blue T-vector に挿入して Sambrook ら<sup>98)</sup>の方法により *E. coli* DH5 $\alpha$  に形質転換した (Appendix-2 参照)。EmeraldAmp PCR Master Mix (TaKaRa) を用いたコロニーPCR によってインサートチェックを行い目的遺伝子の導入が期待されたコロニーからプラスミドを抽出した。その後、Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB) を用いたダイプライマー反応による DNA シークエンシングを行い、塩基配列を決定した (LI-COR, NEN Global Edition IR2 System, LIC4200L)。

次に、*Lb. acetotolerans* HT のゲノム DNA を各制限酵素で消化して、Ligation High Ver.2 (Toyobo) を用いてセルフライゲーションを行った (Appendix-2 参照) ものをテンプレートにし、D-LDH-f2 および D-LDH-r2 プライマー (Table 2-2) を用いて PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa) により inverse PCR を行った。なお、PCR のサイクリング条件は 2 step により行った (Tables 2-5 and 2-6)。増幅産物が得られたものの中から、*SacI* 消化産物をセルフライゲーションしたものをテンプレートとして、3 step (Tables 2-5 and 2-7) による PCR を行い、増幅した DNA 断片のクローニングを行った。増幅した DNA 断片を QIAGEN II Agarose Gel Extraction Kit を用いてゲルから切り出し、精製後、Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (TaKaRa) を用いて dA を付加し T-vector pMD20 への TA クローニングを行い、塩基配列を分析した。これにより *ldhD* 遺伝子上流域と下流域の塩基配列が明らかとなった。*ldhD* 遺伝子の全領域のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖が確認されたため、その塩基配列を基にサブクローンを作製して、全塩基配列を決定した。

Inverse PCR により *ldhD* 遺伝子の大きな塩基配列が明らかとなったため、*ldhD* 遺伝子の外側にプライマー D-LDH-f3 および D-LDH-r3(*HincII*)を設計した (Table 2-2)。*Lb. acetotolerans* HT のゲノム DNA をテンプレートとして、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa) により PCR を行い (Tables 2-8 and 2-9)、得られた増幅産物を Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (TaKaRa) を用いて dA を付加して T-vector pMD20 に挿入し、pMD20-2.0 kb-D-LDH-f3(*BglII*)-D-LDH-r3(*HincII*)を構築した。さらに、①*HindIII* で消化させ、セルフライゲーションしたプラスミド、②*HindIII* および *EcoRI* で消化し、得られた 0.7-kb *HindIII*-*EcoRI* 断片を pBluescript II KS<sup>+</sup>に挿入したプラスミド、③*EcoRI* で消化し、セルフライゲーションしたプラスミドを *E. coli* DH5 $\alpha$  に形質転換し、サブクローンを作製した。DNA シークエンシングにより、*ldhD* 遺伝子およ

びその周辺領域の塩基配列を決定した。また、BLAST 検索<sup>99)</sup>を行った。

**Table 2-2 Primers used in this study**

Primer	Sequence
D-LDH-f1	5'- YTIMGIAAYGTIGGGTIGA-3'
D-LDH-r1	5'- ACIGCRTGIGTIGTRTARAA-3'
D-LDH-f2	5'-AAGAATTCCCAGACAAGCGTTTAGC-3'
D-LDH-r2	5'-AGGAACGTTGGTAATTTCAAGC-3'
D-LDH-f3	5'-CCAGATCTTCTGGCTGCCCACATCAGTATC-3'
D-LDH-r3(HincII)	5'-GAGTCAAC*GAAGTTATCTCAACCTTGTCAT-3'

\*HincII recognition site

**Table 2-3 Components of reaction mixture**

Components	Volume (μL)	Final Concentration
10×Ex Taq buffer (Mg <sup>2+</sup> free)	5	1×
2.5 mM dNTP	4	0.5 mM each
D-LDH-f1 primer (10 μM)	2.5	0.5 mM
D-LDH-r1 primer (10 μM)	2.5	0.5 mM
Template DNA	X	500 ng
Ex Taq HS DNA Polymerase	0.25	1.0 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 2-4 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	5 min
Denature	94°C	1 min
Anneal	48°C	1 min
Extend	72°C	1 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	∞

**Table 2-5 Components of reaction mixture**

Components	Volume (μL)	Final Concentration
5×PrimeSTAR buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	10	1×
2.5 mM dNTP	4	0.2 mM each
D-LDH-f2 primer (10 μM)	1	0.2 mM
D-LDH-r2 primer (10 μM)	1	0.2 mM
Template DNA (10 μg/mL)	10	0.1 mg
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5 units/μL)	0.5	2.5 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 2-6 Thermal cycling condition. 2steps**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Extend	68°C	10 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	∞



**Table 2-7 Thermal cycling condition. 3steps**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	55°C	15 sec
Extend	72°C	3 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	∞

**Table 2-8 Components of reaction mixture**

Components	Volume (μL)	Final Concentration
5×PrimeSTAR buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	10	1×
2.5 mM dNTP	4	0.2 mM each
D-LDH-f3 primer (10 μM)	1	0.2 mM
D-LDH-r3(HincII) primer (10 μM)	1	0.2 mM
Template DNA	X	100 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5 units/μL)	0.5	2.5 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 2-9 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	55°C	15 sec
Extend	72°C	2 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	∞

#### 2-2-4 L-lactate dehydrogenase 遺伝子 (*ldhL1*) のクローニング

使用したプライマーを Table 2-10 に示す。

*ldhD* 遺伝子のクローニングと同様に、さまざまな乳酸菌の L-LDH 保存領域に基づき、L-LDH-f1.2 および L-LDH-r1 プライマーを設計した (Table 2-10)。 *Lb. acetotolerans* HT ゲノム DNA をテンプレートとし Ex Taq HS DNA Polymerase を用いて degenerate PCR を行った (Tables 2-11 and 2-12)。約 0.5-kb の増幅産物が得られ、これを QIAGEN II Agarose Gel Extraction Kit を用いてゲルから切り出し精製後、pT7Blue-T ベクターにクローニングして塩基配列を決定した。

次に、 *Lb. acetotolerans* HT のゲノム DNA を各制限酵素で消化して、Ligation High Ver.2 を用いてセルフライゲーションを行った。これをテンプレートとして、L-LDH-f2 および L-LDH-r2 プライマー (Table 2-10) を用いて PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) により inverse PCR を行った。PCR のサイクル条件は 2 step により行った (Tables 2-13 and 2-14)。増幅産物が得られたもののなかから、 *Pst*I 消化産物をセルフライゲーションしたものをテンプレートとして、3 step による PCR を行い (Tables 2-13 and 2-15)、増幅した DNA 断片 (約 2-kb) を QIAGEN II Agarose Gel Extraction Kit を用いてゲルから切り出し精製した。その後、Mighty TA-cloning Reagent Set for

PrimeSTAR を用いて dA を付加して T-vector pMD20 にクローニングし、塩基配列を分析した。これにより *ldhL* (*ldhL1*) 遺伝子上流域と下流域の塩基配列が明らかとなった。

Inverse PCR により *ldhL1* 遺伝子の大きな塩基配列が明らかとなったため、*ldhL1* 遺伝子外側の *XbaI* 部位にプライマーを設計した (Table 2-10)。 *Lb. acetotolerans* HT のゲノム DNA をテンプレートとして、Tks Gflex DNA Polymerase により PCR を行った (Tables 2-16 and 2-17)。次に、得られた 1.7-kb の増幅産物を Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR を用いて dA を付加し T-vector pMD20 に挿入して pMD20-1.7 kb-L-LDH-f3(*XbaI*)-L-LDH-r3(*XbaI*) プラスミドを構築した。DNA シークエンシングにより *ldhL1* 遺伝子およびその周辺領域の塩基配列を決定し、BLAST 検索<sup>99)</sup>を行った。

**Table 2-10 Primers used in this study**

Primer	Sequence
L-LDH-f1.2	5'-YTIGTIGGIGAYGGIGCIGTIGG-3'
L-LDH-r1	5'-CCRTARAAIGTIGCICCYTT-3'
L-LDH-f2	5'-AAGACAAGCTTGATGAAATTCATAAGAGTG-3'
L-LDH-r2	5'-ACCCAATTCTTGGGCAATACCTTGG-3'
L-LDH-f3( <i>XbaI</i> )	5'-GAAAGTAGGCACCATT <u>TCTAGA</u> *ATTGCCGG-3'
L-LDH-r3( <i>XbaI</i> )	5'-CAGTTTCGTCG <u>TCTAGA</u> *ATAGGAAC-3'

\**XbaI* recognition site

**Table 2-11 Components of reaction mixture**

Components	Volume ( $\mu$ L)	Final Concentration
10 $\times$ Ex Taq buffer (Mg <sup>2+</sup> free)	5	1 $\times$
2.5 mM dNTP	4	0.5 mM each
L-LDH-f1.2 primer (10 $\mu$ M)	2.5	0.5 mM
L-LDH-r1 primer (10 $\mu$ M)	2.5	0.5 mM
Template DNA	X	500 ng
Ex Taq HS DNA Polymerase	0.25	1.0 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 2-12 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	5 min
Denature	94°C	1 min
Anneal	55°C	1 min
Extend	72°C	1 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	$\infty$

**Table 2-13 Components of reaction mixture**

Components	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Final Concentration
5 $\times$ PrimeSTAR GXL buffer	10	1 $\times$
2.5 mM dNTP	4	0.2mM each
L-LDH-f2 primer (10 $\mu\text{M}$ )	1	0.2 mM
L-LDH-r2 primer (10 $\mu\text{M}$ )	1	0.2 mM
Template DNA	X	0.2 mg
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1.25 units/ $\mu\text{L}$ )	1	2.5 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 2-14 Thermal cycling condition. 2 steps**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Extend	68°C	10 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	$\infty$

**Table 2-15 Thermal cycling condition. 3 steps**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	60°C	15 sec
Extend	68°C	3 min (to step 2 x 35)
Cool	4°C	$\infty$

**Table 2-16 Components of reaction mixture**

Components	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Final Concentration
2 $\times$ Gflex PCR buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ , dNTP plus)	25	1 $\times$
L-LDH-f3(XbaI) primer (10 $\mu\text{M}$ )	1	0.2 mM
L-LDH-r3(XbaI) primer (10 $\mu\text{M}$ )	1	0.2 mM
Template DNA	X	200 ng
Tks Gflex DNA Polymetase (1.25 units/ $\mu\text{L}$ )	1	2.5 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 2-17 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	60°C	15 sec
Extend	68°C	1 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	$\infty$

## 2-2-5 L-lactate dehydrogenase 遺伝子 (*ldhL2*) のクローニング

*Lb. acetotolerans* の研究報告例は少ないが、*Lb. acetotolerans* RIB 9124 (NBRC 13120) の全ゲノム配列が明らかとなっており、L-LDH1 以外に、もう一つの L-LDH 遺伝子の存在が予想された。この L-LDH を L-LDH2 とし、配列情報をもとに L-LDH2-f1 および L-LDH2-r1 プライマーを設計した (Table 2-18)。*Lb. acetotolerans* HT ゲノム DNA をテンプレートとし Ex Taq HS DNA Polymerase により PCR を行った (Tables 2-19 and 2-20)。約 0.8-kb の増幅産物が得られ、これを QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。その後、DTCS クイックスタートキット (BECKMAN COULTER) を用いてダイレクト DNA シークエンシング (GenomeLab GeXP/CEQ System) を行い、塩基配列を決定した。

次に、*Lb. acetotolerans* HT のゲノム DNA を各制限酵素で消化して、Ligation High Ver.2 を用いてセルフライゲーションを行った。これをテンプレートにして、L-LDH2-f3 (inverse) および L-LDH2-r3 (inverse) プライマー (Table 2-18) を用いて LA Taq DNA Polymerase (TaKaRa) による inverse PCR を行った (Tables 2-21 and 2-22)。その結果、*Hind*III 消化産物をセルフライゲーションしたものをテンプレートとした PCR において、約 0.6-kb の増幅産物が得られた。増幅産物をゲルから切り出し、QIAGEX II Agarose Gel Extraction Kit を用いて精製した後、T-vector pMD20 にクローニングして塩基配列を決定した。これにより *ldhL2* 遺伝子の約 100 塩基下流域の配列を決定したが、上流域は約 10 塩基程度しか明らかにならなかった。上流域のクローニングを行うために、L-LDH2-f4 (inverse) および L-LDH2-r4 (inverse) プライマー (Table 2-18) を設計した。*Lb. acetotolerans* HT 株ゲノム DNA を制限酵素 *Pst*I で断片化し、セルフライゲーションして環状化したものを鋳型に LA Taq DNA Polymerase による inverse PCR を行った (Tables 2-23 and 2-24)。約 2.0-kb の増幅産物が得られ、これをダイレクトシークエンスし、塩基配列を決定した。さらに上流域の塩基配列の決定を進めるため、*ldhL2* 遺伝子上流域の *Eco*RI 部位より外側にプライマー L-LDH2-f6 (UP) を設計し、L-LDH2-f6 (UP) および L-LDH2-r4 (inverse) プライマー (Table 2-18) を用いて *Lb. acetotolerans* HT のゲノム DNA を鋳型に PCR を行った (Tables 2-25 and 2-26)。約 0.6-kb の増幅産物が得られ、これをダイレクトシークエンスし、塩基配列を決定した。その後、*ldhL2* 遺伝子およびその周辺領域の塩基配列を決定し、BLAST 検索<sup>99)</sup>を行った。

**Table 2-18 Primers used in this study**

Primer	Sequence
L-LDH2-f1	5'-CTTTTGCAGAATACTAATGTAGATGA-3'
L-LDH2-r1	5'-TAAAACTTCTTGCATCTTATTTGGCTGA-3'
L-LDH2-f3 (inverse)	5'-CAGATGTACGTAAAAAGGGTGGAAA-3'
L-LDH2-r3 (inverse)	5'-CCAGTCTTGTTCACCTGGTTTACG-3'
L-LDH2-f4 (inverse)	5'-GTCACCTTGATTCAGCCCGTCTTCTTCGC-3'
L-LDH2-r4 (inverse)	5'-GCAAAAAGTTGAACCTACGGCACCATC-3'
L-LDH2-f6 (UP)	5'-AAGATGATCGGGAGTTTAGTAGAACAA-3'

**Table 2-19 Components of reaction mixture**

Components	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Final Concentration
10 $\times$ Ex Taq buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ free)	5	1 $\times$
2.5 mM dNTP	4	0.5 mM each
L-LDH2-f1 primer (10 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 mM
L-LDH2-r1 primer (10 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 mM
Template DNA	X	500 ng
Ex Taq HS DNA Polymerase	0.25	1.0 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 2-20 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94 $^{\circ}\text{C}$	3 min
Denature	98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec
Anneal	51 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
Extend	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min (to step 2 x 30)
Cool	4 $^{\circ}\text{C}$	$\infty$

**Table 2-21 Components of reaction mixture**

Components	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Final Concentration
10 $\times$ LA Buffer II ( $\text{Mg}^{2+}$ free)	5	1 $\times$
25 mM $\text{MgCl}_2$	5	2.5 mM
2.5 mM dNTPs	8	0.4 mM each
L-LDH2-f3 (inverse) primer (10 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 mM
L-LDH2-r3 (inverse) primer (10 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 mM
Template DNA	X	0.2 mg
TaKaRa LA Taq DNA Polymerase (5 units/ $\mu\text{L}$ )	0.5	2.5 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 2-22 Thermal cycling condition. 3 steps**

	Temperature	Time
Preheat	94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
Denature	94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
Anneal	60 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
Extend	68 $^{\circ}\text{C}$	20 min (to step 2 x 30)
Cool	4 $^{\circ}\text{C}$	$\infty$

**Table 2-23 Components of reaction mixture**

Components	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Final Concentration
10 $\times$ LA Buffer II ( $\text{Mg}^{2+}$ free)	5	1 $\times$
25 mM $\text{MgCl}_2$	5	2.5 mM
2.5 mM dNTPs	8	0.4 mM each
L-LDH2-f4 (inverse) primer (10 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 mM
L-LDH2-r4 (inverse) primer (10 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 mM
Template DNA	X	0.2 mg
TaKaRa LA Taq DNA Polymerase (5 units/ $\mu\text{L}$ )	0.5	2.5 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 2-24 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	30 sec
Denature	98°C	10 sec
Extend	68°C	20 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	∞

**Table 2-25 Components of reaction mixture**

Components	Volume (μL)	Final Concentration
5×PrimeSTAR buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	10	1×
2.5 mM dNTP	4	0.2m M each
L-LDH2-f6 (UP) primer (10 μM)	1	0.2 mM
L-LDH-r4 (inverse) primer (10 μM)	1	0.2 mM
Template DNA	X	100 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5 units/μL)	0.5	2.5 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 2-26 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	55°C	5 sec
Extend	72°C	1 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	∞

### 2-2-6 *ldhD*、*ldhL1* および *ldhL2* 遺伝子の異種発現

全塩基配列が明らかになった *ldhD*、*ldhL1* および *ldhL2* 遺伝子の機能を確認するために、大腸菌による異種発現を行った。各 LDH 遺伝子の SD 配列から終始コドンまで含むように設計した Table 2-27 の forward および reverse プライマーを用い、*Lb. acetotolerans* HT ゲノム DNA を鋳型として、PrimeSTAR HS DNA Polymerase により PCR を行った (Tables 2-28 and 2-29)。PCR で増幅した約 1-kb の PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製し、Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR を用いて dA を付加、あるいは Mighty Cloning Reagent Set <Blunt End> (TaKaRa) を用いた Blunting Kination 反応後、T-vector pMD20 または pUC118 *HincII*/BAP に挿入した。その後、これを制限酵素 *ApaI* および *XhoI* で消化し、pBluescript II KS<sup>+</sup>の *ApaI* および *XhoI* 部位にクローニングした。DNA シークエンシングによって、目的遺伝子が導入されていることを確認し、それぞれプラスミド pBS-*ldhD*、pBS-*ldhL1* および pBS-*ldhL2* とした。構築したプラスミドおよびコントロールとしての pBluescript II KS<sup>+</sup>をそれぞれ *E. coli* DH5 $\alpha$  に導入して、組換え株 DH5 $\alpha$ /pBS-*ldhD*、DH5 $\alpha$ /pBS-*ldhL1*、DH5 $\alpha$ /pBS-*ldhL2* および DH5 $\alpha$ /pBluescript II KS<sup>+</sup>を作製して培養した。

300 mL 容三角フラスコを用いて、静置 (嫌気) または 100 strokes/min 振とう (微好気) 培養を行った。作製した組換え株を前培養培地である 1.5 mL の LB 培地 (100  $\mu$ g/mL アンピシリン含有) に植菌し、37°C で振とう培養を行った。約 15 時間培養後、本培養培地である 100 mL LB 培地 (100  $\mu$ g/mL アンピシリン含有) に組換え株をそれぞれ 1% (v/v) 接種し、37°C で静置または振とう培養を行った。培養液を分取して、分光光度計で 600 nm における吸光度を測定し、OD<sub>600</sub>=0.6~0.8 となったところで、1 mM となるように IPTG を培地に添加した。IPTG 添加後、3 時間培養を行い、終濃度が 2% (w/v) となるように 20% グルコースを添加し、24 時間 (総時間) 培養した。培養後、600 nm における濁度を測定した。さらに培養液を遠心分離 (7,780 $\times$ g, 10 min, 4 °C) し、上清を得た。D-Lactic acid/L-Lactic acid F-キット (Roche) を用いて D-および L-乳酸濃度を、バイオセンサー (ポータブルグルコース計 GF-501、Tanita) を用いてグルコース濃度を測定した。そして、上清中の総乳酸濃度 (C<sub>LA</sub>) とグルコース消費濃度 (C<sub>Glc</sub>) により乳酸変換率 (%) を調べた。

$$\text{乳酸変換率 (\%)} = C_{LA} / C_{Glc} \times 100$$

**Table 2-27 Primers used in this study**

Primer	Sequence
ldhD-SD(ApaI)-f	5'- <u>GGGCCC</u> <sup>a)</sup> TTGGGAGGTTGAATTTATGACAAA-3'
ldhD-XhoI(TAA)-r	5'- <u>CTCGAG</u> <sup>b)</sup> TTATGCATCTAATTTAACTGGGCT-3'
ldhL-SD(ApaI)-f	5'- <u>GGGCCC</u> <sup>a)</sup> CAAAGGAGACATATTATGGTAAA-3'
ldhL-XhoI(TAA)-r	5'- <u>CTCGAG</u> <sup>b)</sup> TTATTGACGAACCTTAACGCCAGT-3'
ldhL2-SD(ApaI)-f	5'- <u>GGGCCC</u> <sup>a)</sup> TGAAAGGAAATTAATTATGAGTA-3'
ldhL2-XhoI(TAA)-r	5'- <u>CTCGAG</u> <sup>b)</sup> TTAATTCAAATCAATTCCGTCTAA-3'

<sup>a)</sup>*ApaI* recognition site, <sup>b)</sup>*XhoI* recognition site

**Table 2-28 Components of reaction mixture**

Components	Volume (μL)	Final Concentration
5×PrimeSTAR buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	10	1×
2.5 mM dNTP	4	0.2 mM each
Forward primer (10 μM)	1	0.2 mM
Reverse primer (10 μM)	1	0.2 mM
Template DNA	X	100 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5 units/μL)	0.5	2.5 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 2-29 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	55°C	5 sec
Extend	72°C	2 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	∞



## 2-3 結果および考察

### 2-3-1 *Lb. acetotolerans* HT の LDH 遺伝子のクローニング

*Lb. acetotolerans* HT の D-LDH および L-LDH1 遺伝子 (*ldhD* および *ldhL1*) をクローニングするために、degenerate および inverse PCR を行い、1.8-kb *DraI-HincII* 領域 (*ldhD*) (accession number LC378394 in EMBL, GenBank and DDBJ) と 1.7-kb *XbaI* 断片 (*ldhL1*) (accession no. LC378395 in EMBL, GenBank and DDBJ) の全塩基配列を決定した (Figs. 2-1A and 2-1B)。その結果、*ldhD* 遺伝子は 1,005 塩基対からなり、334 アミノ酸残基からなる推定分子量 37 kDa のタンパク質を、*ldhL1* 遺伝子は 972 塩基対からなり、323 アミノ酸残基からなる推定分子量 35 kDa のタンパク質をそれぞれコードしていると考えられた。

クローニングした *ldhD* 遺伝子の塩基配列を BLAST 検索したところ、*Lb. acetotolerans* DSM 20749 (JCM 3825) の D-LDH のアミノ酸配列 (GenBank accession number: KRN36956.1) と 100%、*Lb. acetotolerans* RIB 9124 (NBRC 13120) の D-LDH のアミノ酸配列 (accession no. BAQ56456.1) と 99%の相同性を示した。*Lb. acetotolerans* HT の推定 D-LDH は、312 位にリシン残基を有していたが、*Lb. acetotolerans* RIB 9124 では、同じ位置にアルギニン残基を有していたため、完全には一致しなかった。また、*ldhD* 遺伝子上流域では、ORF が逆向きに存在しており、*Lb. acetotolerans* DSM 20749 (accession no. KRN36955.1) および *Lb. acetotolerans* RIB 9124 (accession no. BAQ56457.1) の aminoglycoside phosphotransferase fructosamine kinase 遺伝子の 5'末端領域と相同性を示した (Fig. 2-1A)。*ldhD* 遺伝子下流域では、*Lactobacillus helveticus* (accession no. PAW05974.1) の transposase の 3'末端領域に相同性を示す ORF が逆向きに存在していた (相同性 84%)。

一方、*ldhL1* 遺伝子の塩基配列を BLAST 検索したところ、*Lb. acetotolerans* DSM 20749 (accession no. KRN40783.1) および *Lb. acetotolerans* RIB 9124 (accession no. BAQ56724.1) の L-LDH のアミノ酸配列と 100%一致していた。*ldhL1* 遺伝子上流域では、*Lactobacillus jensenii* JV-V16 の transposase (accession no. EFH30272.1) をコードする遺伝子の一部と相同性を示した (Fig. 2-1B)。しかしながら、HT 株の推定 transposase のアミノ酸残基の 6 位および 21 位に終止コドンが見出され、遺伝子が transposase として機能しないことが示唆された。*ldhL1* 遺伝子下流域では、*Lb. acetotolerans* DSM 20749 (accession no. KRN40782.1) および *Lb. acetotolerans* RIB 9124 (accession no. BAQ56723.1) の CBS domain-containing protein をコードする遺伝子の一部と相同性を示した。

*Lb. acetotolerans* RIB 9124 のゲノム情報によると、D-LDH をコードする 1 つの遺伝子と L-LDH をコードする 2 つの遺伝子が予測されている。HT 株において、L-LDH として、L-LDH1 遺伝子 (*ldhL1*) 以外に、もう一つの L-LDH 遺伝子 (*ldhL2*) を有する可能性があったため、*Lb. acetotolerans* RIB 9124 のもう一つの L-LDH (accession no. BAQ57206.1) の塩基配列からプライマーを設計した。*Lb. acetotolerans* HT のゲノム

DNA の PCR および inverse PCR を行い、1.5-kb *EcoRI-HindIII* 領域 (*ldhL2*) (accession no. LC378396 in EMBL, GenBank and DDBJ) の全塩基配列を決定した (Fig. 2-1C)。その結果、*ldhL2* 遺伝子は 930 塩基対からなり、309 アミノ酸残基からなる推定分子量 33 kDa のタンパク質をコードしていると考えられた。クローニングした *ldhL2* 遺伝子の塩基配列を BLAST 検索したところ、*Lb. acetotolerans* DSM 20749 (accession no. KRN40946.1) および *Lb. acetotolerans* RIB 9124 (accession no. BAQ57206.1) の L-LDH のアミノ酸配列とそれぞれ 100% および 99% の相同性を示した。*Lb. acetotolerans* HT および DSM 20749 株の推定 L-LDH2 は、135 位にグルタミン酸残基を有していたが、*Lb. acetotolerans* RIB 9124 および *Lb. acetotolerans* HT と相同性 (> 84%) が高かった *Lactobacillus* 種は同じ位置にプロリン残基を有していた。推定の *ldhL2* 遺伝子上流域 および下流域では、*Lb. acetotolerans* DSM 20749 (accession no. KRN409451 および KRN409471) および *Lb. acetotolerans* RIB 9124 (accession no. BAQ572051 および BAQ572071) の flavocytochrome c と dimethylmenaquinone methyltransferase をコードする遺伝子の一部とそれぞれ 100% の相同性を示した。

また、HT 株の各 LDH の相同性については、D-LDH と L-LDH1 で 13%、D-LDH と L-LDH2 で 10%、そして L-LDH1 と L-LDH2 で 29% と低かった。つまり、*Lb. acetotolerans* HT は少なくとも異なる 3 つの LDH を有していることが推定された。

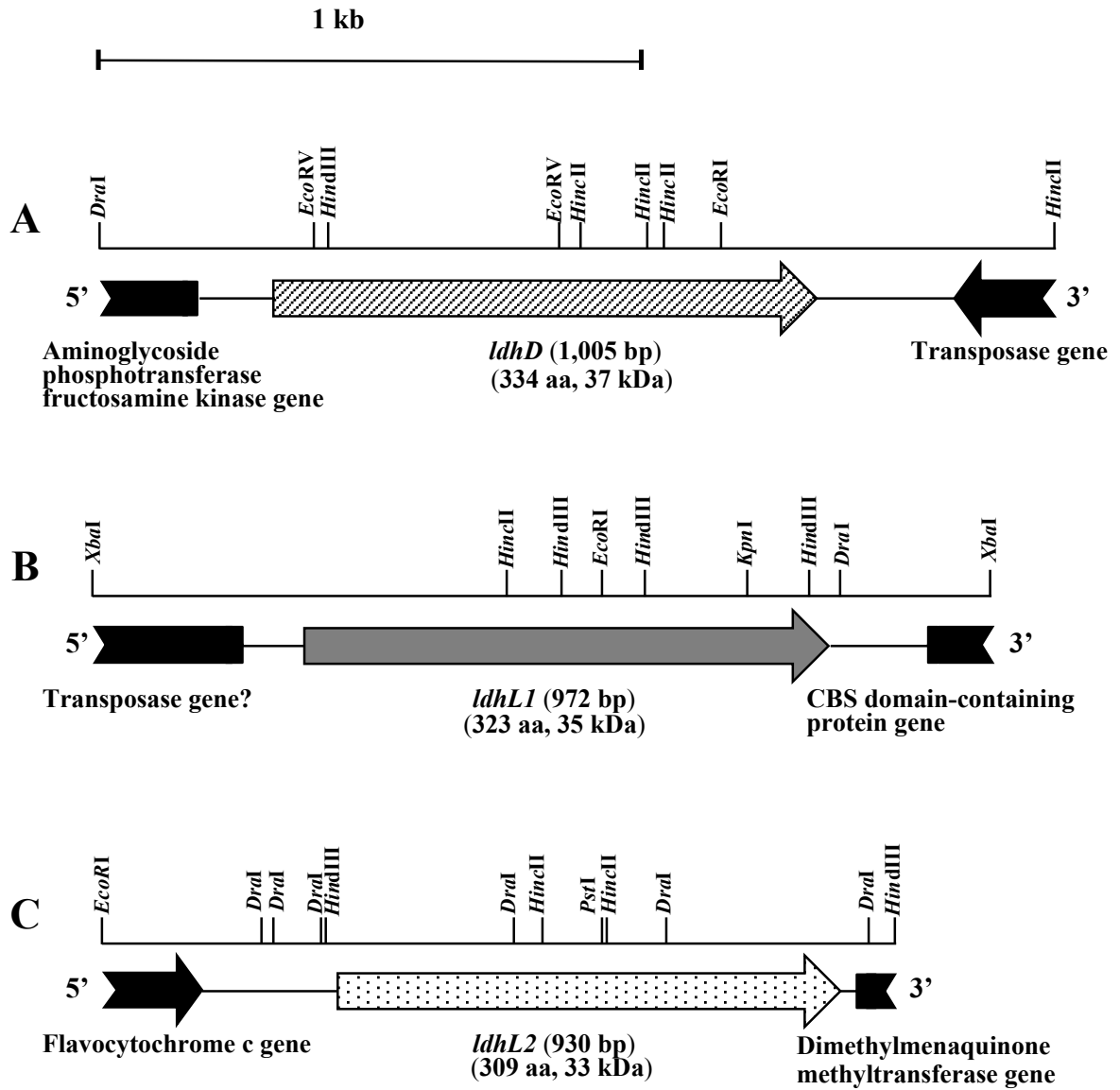


Fig. 2-1 Schematic representations and restriction map of the three different genes for LDHs

### 2-3-2 *Lb. acetotolerans* HT の LDH 遺伝子の異種発現

HT 株の各 LDH の機能を調べるため、クローニングした *ldhD*、*ldhL1* および *ldhL2* 遺伝子を大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換して異種発現を行った。300 mL 容三角フラスコを用いて、静置（嫌気）または 100 strokes/min 振とう（微好気）培養を行い、培養後の上清の乳酸濃度およびグルコース濃度を測定した。D-および L-乳酸のそれぞれの生産量（g/L）と乳酸変換率（%）を Fig. 2-2 に、菌体量（OD<sub>600</sub>）、グルコース消費量、総乳酸生産量および最終 pH を Table 2-30 に示す。

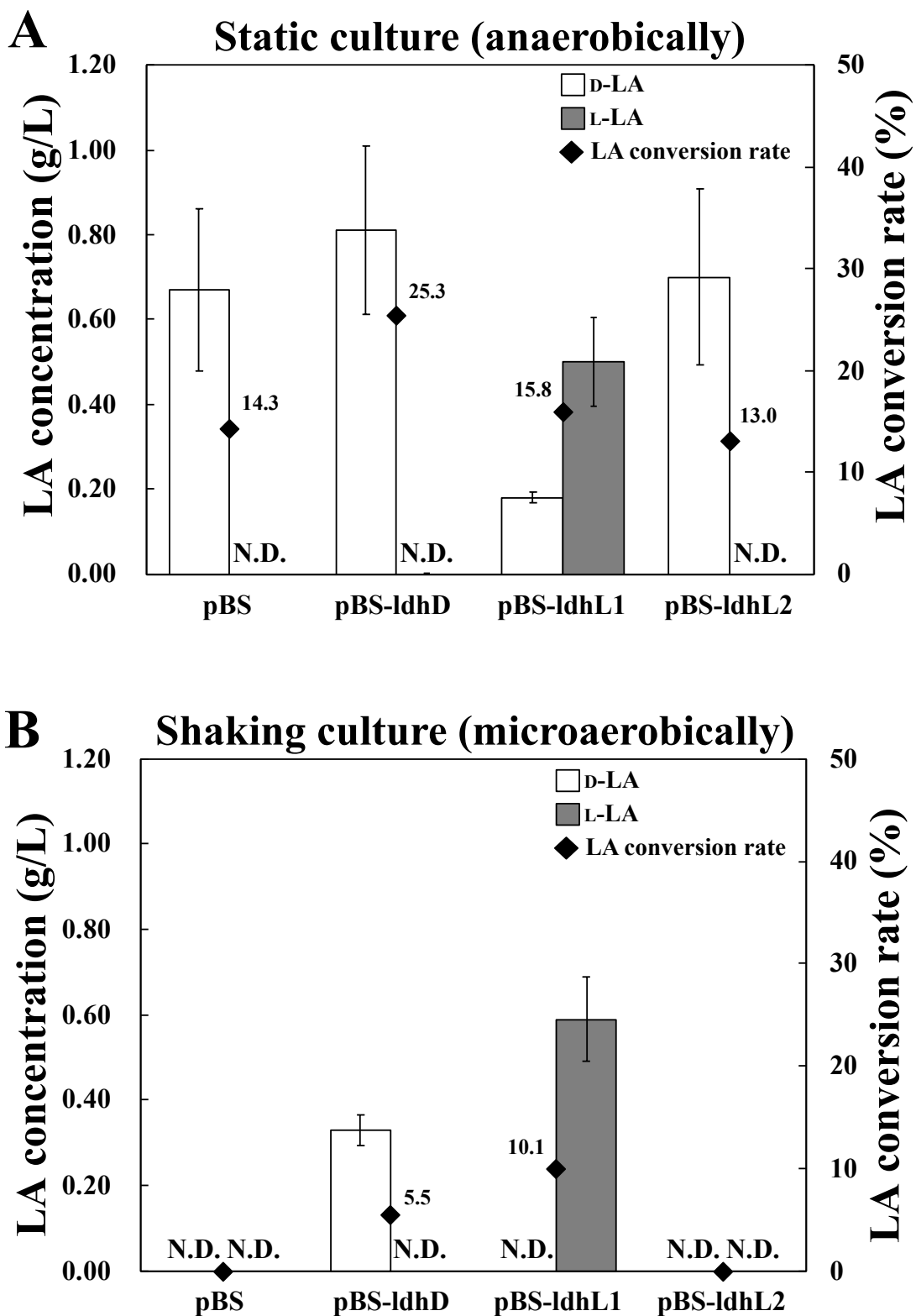
静置培養において、組換え株が生産した総乳酸濃度（0.67–0.81 g/L）は、ほぼ同量であったが、D-乳酸濃度および L-乳酸濃度はそれぞれの株で異なった（Fig. 2-2A and Table 2-30）。大腸菌は D-LDH をコードする *ldhA* 遺伝子を保有しているため、D-乳酸を生産する<sup>13, 100, 101</sup>。また、*ldhA* 遺伝子は、嫌気条件および低 pH において発現が高まる<sup>100, 102</sup>。そのため、コントロールとして pBluscript II KS<sup>+</sup>を導入した組換え株は D-乳酸（0.67 g/L）を生産した（Fig. 2-2A）。DH5 $\alpha$ /pBS-*ldhD*（0.81 g/L）はコントロールよりも多く D-乳酸を生産する傾向がみられ、乳酸変換率（25.3%）も他の株と比べて高かった（Fig. 2-2A）。このことから *ldhA* 遺伝子に加え、*ldhD* 遺伝子を導入することによって D-LDH の生成量が高まったと考えられた。しかしながら、菌体量（OD<sub>600</sub> = 1.00）は他の株と比較して低く、乳酸生産により菌体の増殖速度が減少したこと推察された（Table 2-30）。一方、DH5 $\alpha$ /pBS-*ldhL1* の D-乳酸生産量（0.18 g/L）はコントロールよりも低かったが、L-乳酸（0.50 g/L）が生産された（Fig. 2-2A）。これは、*ldhL1* 遺伝子を導入して発現した L-LDH により、ピルビン酸からの D-乳酸生産量が減少し、代わりに L-乳酸が生産されたためと考えられた。また、DH5 $\alpha$ /pBS-*ldhL2* の D-乳酸生産量（0.70 g/L）はコントロールと同等量であった（Fig. 2-2A）。

振とう培養において、コントロールは乳酸を生産しなかった（< 0.01 g/L）、DH5 $\alpha$ /pBS-*ldhD* は D-乳酸（0.33 g/L）、DH5 $\alpha$ /pBS-*ldhL1* は L-乳酸（0.59 g/L）を生産した（Fig. 2-2 B）。*ldhL1* 遺伝子導入株の菌体量（OD<sub>600</sub> = 4.07）および乳酸変換率（10.1%）は他の組換え株と比べて高くなる傾向がみられた（Table 2-30）。一方、DH5 $\alpha$ /pBS-*ldhL2* はコントロールと同様に乳酸を生産しなかった（Fig. 2-2B and Table 2-30）。

以上の結果より、今回クローニングした HT 株の *ldhD* および *ldhL1* 遺伝子がコードするタンパク質は、それぞれ D-LDH および L-LDH の機能を有することが明らかとなった。しかしながら、*ldhL2* 遺伝子は、異種発現においては LDH の機能を見出すことができなかった。そこで、HT 株の推定 L-LDH2 について、Pfam<sup>103</sup>によりドメイン解析を行うと、D-および L-LDH と同様に Ldh 1 N (lactate/malate dehydrogenase, NAD binding domain, amino acid positions 3 to 141) および Ldh 1 C (lactate/malate dehydrogenase,  $\alpha/\beta$  C-terminal domain, amino acid positions 144 to 306) の 2 つのドメインを含むことがわかった。乳酸菌のいくつかの株で LDH の異性体の存在が報告されており、例えば、*Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* KCTC 2535 においては、ゲノム情報から 2 つの D-LDH および 6 つの L-LDH の存在が予測されている。しかしながら、6 つの L-LDH のうち 3 つの L-LDH は、その機能を有していなかったことが報告されている<sup>104</sup>。ま

た、これまでに HT 株の推定 L-LDH2 と高い相同性 (>67%) を示す他の *Lactobacillus* 属細菌の L-LDH 活性についての報告例は未だない。したがって、HT 株の推定 L-LDH2 は LDH としての機能を有さない可能性がある。今後、推定 L-LDH2 の機能を確認するために、*in vitro* における活性や HT 株の *ldhL1* 遺伝子破壊株による L-乳酸生産性を調べる必要がある。

*Lb. acetotolerans* HT を 1% (v/v) 酢酸含有 MRS 培地 (10 mL) の試験管において 30°C、2 日間培養した場合、D-および L-乳酸は 3:1 の割合で生産された (data not shown)。つまり、HT 株の D-LDH は L-LDH よりもピルビン酸に対する親和性および反応性が高いと予想される。また、HT 株は L-LDH 遺伝子破壊により D-乳酸のみを多量に生産することも予測される。



**Fig. 2-2 LA concentration in culture supernatant and conversion rate of glucose to LA.**

Cells were cultivated at 37°C for 24 h in a 300-mL conical flask containing 100 mL of LB medium with 2% (w/v) glucose. White bar, D-LA concentration; gray bar, L-LA concentration; diamond, conversion rate of glucose to D- and L-LAs. N.D., Not Detected (<0.01 g/L).

**Table 2-30 Heterologous expression of LDH genes in *E. coli* DH5 $\alpha$ .**

Culture condition	Plasmid	OD <sub>600</sub>	Glucose consumption (g/L) <sup>a)</sup>	LA concentration (g/L) <sup>b)</sup>	Final pH
Static culture (anaerobically)	pBluescript II KS <sup>+</sup>	1.70±0.16	4.7±2.2	0.67±0.19	4.83±0.09
	pBS- <i>ldhD</i>	1.00±0.04	3.2±1.5	0.81±0.20	4.88±0.05
	pBS- <i>ldhL1</i>	1.96±0.35	4.3±1.6	0.68±0.10	4.90±0.06
	pBS- <i>ldhL2</i>	1.55±0.05	5.4±2.2	0.70±0.21	4.90±0.04
Shaking culture (microaerobically)	pBluescript II KS <sup>+</sup>	3.18±0.32	6.0±0.9	N.D.	4.84±0.06
	pBS- <i>ldhD</i>	2.70±0.19	6.0±1.2	0.33±0.04	4.87±0.04
	pBS- <i>ldhL1</i>	4.07±0.35	5.9±0.7	0.59±0.10	4.86±0.08
	pBS- <i>ldhL2</i>	3.40±0.34	6.5±1.0	N.D.	4.95±0.05

Cells were cultivated at 37°C for 24 h in a 300-mL conical flask containing 100 mL LB medium with 2% (w/v) glucose.

<sup>a)</sup> Glucose consumption was calculated by subtracting the glucose concentration in the supernatant from that in the medium (20 g/L). <sup>b)</sup> Total LA concentration was calculated by adding the D-LA concentration to the L-LA concentration. N.D., Not Detected (< 0.01 g/L).

## 2-4 小括

本研究において酢酸耐性乳酸菌である *Lb. acetotolerans* HT の LDH 遺伝子 (*ldhD*、*ldhL1* および *ldhL2*) のクローニングとその機能解明を行った。*ldhD* および *ldhL1* 遺伝子において、さまざまな乳酸菌の D-および L-LDH の保存領域に基づいてプライマーを作成し、degenerate および inverse PCR により、構造遺伝子とその周辺を含む領域の塩基配列を決定した (accession no. LC378394 および LC378395)。その後、*Lb. acetotolerans* RIB 9124 の全塩基配列が明らかとなり<sup>20)</sup>、HT 株においても一つの L-LDH (*ldhL2*) 遺伝子の存在が予測された。したがって、この RIB 9124 株の L-LDH (accession no. BAQ57206.1) の塩基配列からプライマーを設計し、PCR を行い、*ldhL2* 遺伝子とその周辺を含む領域の塩基配列を決定した (accession no. LC378396)。*ldhD*、*ldhL1* および *ldhL2* 遺伝子は 1,005、972 および 930 塩基対からなるタンパク質であり、それぞれの推定 LDHs は *Lb. acetotolerans* DSM 20749 および *Lb. acetotolerans* RIB 9124 の LDH のアミノ酸配列と 99-100%の相同性を示した (Fig. 2-1)。

HT 株の各 LDH 遺伝子を導入した大腸菌を振とう培養した結果、*ldhD* および *ldhL1* 遺伝子導入株は、D-乳酸および L-乳酸を生産したが、*ldhL2* 遺伝子導入株は乳酸を生産しなかった (Fig. 2-2B and Table 2-30)。以上より、*ldhD* 遺伝子および *ldhL1* 遺伝子の翻訳産物は、それぞれ D-LDH および L-LDH であることが示されたが、*ldhL2* 遺伝子の翻訳産物は LDH としての機能を見出すことができなかった。今後、*in vitro* によりその機能を確認する必要がある。

HT 株培養後の上清の D-乳酸濃度は L-乳酸濃度の約 3 倍量であり、D-LDH は L-LDH よりもピルビン酸に対する親和性および反応性が高いことが期待される。そのため、次に HT 株の *ldhD* 遺伝子を利用した乳酸ベースポリマーの合成を検討した (第三章参照)。また、HT 株は耐酸性であるため、HT 株の L-LDH 遺伝子破壊株を作製すれば、工業的に D-乳酸生産に利用できる可能性がある。さらに、微生物による乳酸ベースポリマーの合成では、菌体内でモノマーである乳酸を生産させるため、酸に耐性のある HT 株はその宿主として有力な候補である。今後、HT 株の遺伝子破壊株の作製や HT 株を宿主とした乳酸ベースポリマーの合成などの研究が展開されることを期待する。



## 第三章

### *Lactobacillus acetotolerans* HT の

D-乳酸脱水素酵素遺伝子を導入した大腸菌  
組換え株による乳酸ベースコポリマーの合成

### 3-1 緒言

生分解性プラスチックの一つであるポリ乳酸 (PLA) は、一般的に、重金属を触媒とした化学重合により合成される。最近、微生物合成系のポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 重合酵素を D-lactyl-CoA (D-LA-CoA) も重合できるように改変した酵素を用いて、微生物菌体内において乳酸 (LA) ユニットを含む生分解性プラスチック (乳酸ベースポリマー) の合成が試みられている<sup>83)</sup>。この改変 PHA 重合酵素を利用して、LA のみからなるポリマー (PLA) を合成することは難しいが、(R)-3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) モノマーとの共重合体であれば、乳酸ベースポリマーを合成させることができる<sup>80,81,89)</sup>。また、ポリマー鎖中の LA 分率を高めることにより、PLA と似た透明性を有する乳酸ベースポリマーが合成されることが知られている<sup>84)</sup>。そこで、本研究では、LA 分率を高めた乳酸ベースポリマーの合成を試みた。

LA 分率を高めた乳酸ベースポリマーの合成のために、まず D-乳酸生産量を向上させることを考えた。大腸菌は D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) をコードする *ldhA* 遺伝子を有し、これは嫌気的および低 pH 条件において高度に発現される<sup>100,102)</sup>。したがって、大腸菌を嫌気的に培養すると D-乳酸生産量が高まる。しかしながら、嫌気的に培養すると菌体増殖が減少し、最終的に得られる菌体量が減少する。また、生産された D-乳酸 (D-LA) に CoA を付与し、D-LA-CoA とするためには、好氣的培養において生産量が高まるアセチル CoA が必要である<sup>81)</sup>。そこで、好氣的条件においても D-乳酸を生産させるため、大腸菌に外在性の D-LDH 遺伝子を導入することを考えた。

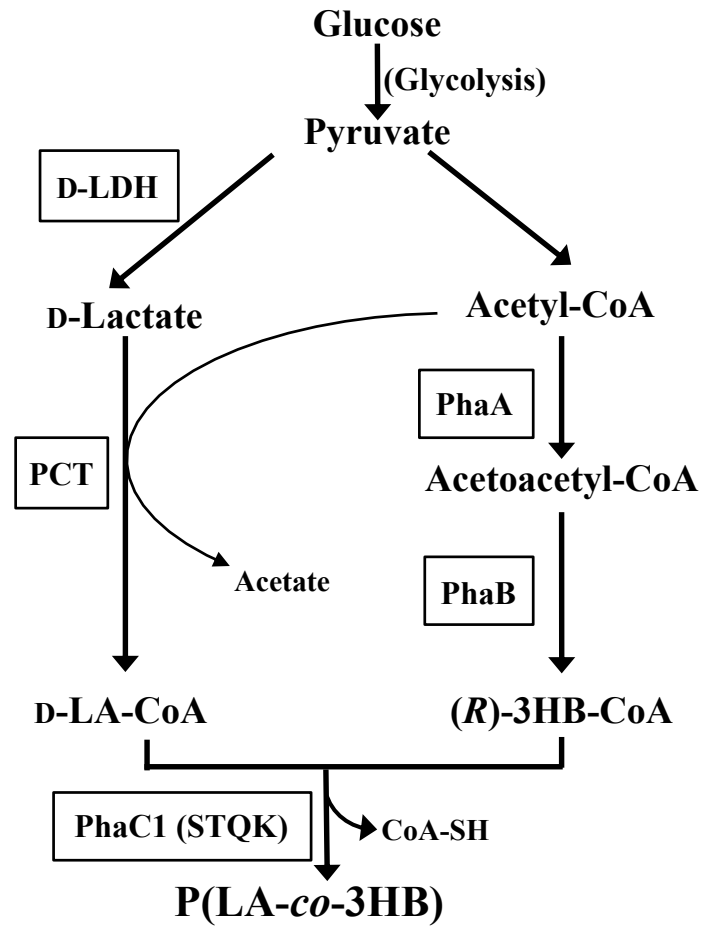
第二章において、耐酸性乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* HT の D-LDH 遺伝子 (*ldhD*) のクローニングと同定に成功した。また、大腸菌を宿主とした LDH の異種発現において、100 strokes/min の振とう培養 (微好氣的) 条件では、コントロールは乳酸をほとんど生産しなかったが (<0.01 g/L)、*Lb. acetotolerans* HT 由来の *ldhD* 遺伝子を導入した組換え DH5 $\alpha$  株は、0.33 g/L の D-乳酸を生産した。そこで、本章では、クローニングした HT 株の *ldhD* 遺伝子をポリマー生合成関連酵素遺伝子とともに大腸菌に導入し、D-乳酸生産量を向上させることで、ポリマー鎖中の LA 分率を高めることを目的とした。

また、これまで、LA 分率を向上させるために、ギ酸の生成経路を遮断した大腸菌 (*pflA* knockout mutant) を宿主に用いた研究が報告されている<sup>81,84,85)</sup>が、これは宿主が限定される。そこで、本研究では、さまざまな大腸菌を宿主とし、LA 分率を向上させた乳酸ベースポリマーの合成を試みた。宿主として、今後の研究展開も考慮し、よくクローニングに用いられる DH5 $\alpha$  株の他に、XL1-Blue 株および LS5218 株を選択した。XL1-Blue 株は、エタノール産生能が低いため、他の大腸菌株と比較して高分子量のポリマーを蓄積する傾向にある<sup>105,106)</sup>。また、LS5218 (*fadR601, atoC2(Con)*) は、脂肪酸代謝制御遺伝子が破壊された株であり<sup>107)</sup>、中鎖長 3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) ユニットを含む PHA 合成の宿主として用いられてきた<sup>56)</sup>。

本章では、これまでに合成されてきた LA ユニットと 3HB ユニットとの乳酸ベー

スコポリマーP(LA-co-3HB)の合成経路を大腸菌に導入し、代謝制御を行った (Fig. 3-1)。本研究では、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の低基質特性 PHA 重合酵素 (PhaC1) を改変した PhaC1(STQK)<sup>82)</sup>の遺伝子と、D-LA に CoA を付与する *Megasphaera elsdenii* 由来のプロピオニル-CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (*pct*)、(R)-3HB-CoA を供給する *Cupriavidus necator* (本章では、*Ralstonia eutropha* と表記) 由来の  $\beta$ -ケトチオラーゼおよび NADPH 依存性アセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子 (*phaA<sub>Re</sub>* および *phaB<sub>Re</sub>*) を保持するプラスミド pTV118NpctC1(STQK)AB<sup>83)</sup>を利用した。まず、HT 株の *ldhD* 遺伝子を pBBR1MCS-2 ベクターに挿入したプラスミドを構築し、pTV118NpctC1(STQK)AB とともに大腸菌に導入して P(LA-co-3HB)の合成を試みた。

また、より効率よく乳酸ベースポリマーを合成させるために、乳酸を生産し、低い pH でも生育できる乳酸菌を宿主として利用することが考えられる。しかし、これらのプラスミドを乳酸菌に導入した場合、遺伝子は発現しない可能性が高い。課題点として、まず、pTV118NpctC1(STQK)AB に *R. eutropha* の *phaCAB* オペロンのプロモーター (*P<sub>Re</sub>*) が存在することがあげられる。このプロモーターを取り除き、乳酸菌発現用プロモーター支配下で、すべての遺伝子を発現するように構築しなければならない。つぎに、2つのプラスミドを宿主に導入しなければならないことがあげられる。1つのプラスミドに乳酸ベースポリマー合成関連酵素遺伝子を挿入する方がプラスミドの不和合性を考慮すると好ましい。そのため、本章では、1つのプラスミドに HT 株の *ldhD* 遺伝子とポリマー合成関連酵素遺伝子を挿入したものを構築し、大腸菌に導入して P(LA-co-3HB)の合成を試みた。これは乳酸菌を宿主とするプラスミドを将来的に構築するための戦略でもある。



**Fig. 3-1 Metabolic control for P(LA-co-3HB) synthesis from glucose**

D-LDH, D-lactate dehydrogenase; PCT, propionyl-CoA transferase; PhaA,  $\beta$ -ketothiolase; PhaB NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; PhaC1(STQK), engineered PHA synthase of *Pseudomonas* sp. 61-3.

## 3-2 実験操作

### 3-2-1 使用した菌株およびプラスミド

以下の菌株およびプラスミドを用いて研究を行った (Table 3-1)。

**Table 3-1 Strains and plasmids used in this study**

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>Lactobacillus acetotolerans</i> HT	Wild strain	JCM 33214, 18)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ( $\text{rK}^{\text{mK}^+}$ ), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(\text{lacZYA-argFV169})$ , $\Phi 80\Delta\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ , F <sup>-</sup>	Clontech
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F <sup>+</sup> <i>proAB</i> , <i>lac</i> <sup>F</sup> , <i>lacZ</i> $\Delta\text{M15}::\text{Tn10}$ (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene
<i>E. coli</i> LS5218	<i>fadR601</i> , <i>atoC2</i> (Con)	107)
<b>Plasmids</b>		
T-vector pMD20	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap <sup>r</sup> , <i>lacPOZ</i> , SP promoter	TaKaRa
pBluescript II KS <sup>+</sup>	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap <sup>r</sup> , <i>lacPOZ</i> , T7 and T3 promoter	Stratagene
pBBR1MCS-2	Km <sup>r</sup> , broad host range, <i>lacPOZ</i>	108)
pTV118NpctC1(STQK)AB	pTV118N derivative; P <sub>lac</sub> , <i>pct</i> , P <sub>Re</sub> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>phaA</i> , <i>phaB</i> , T <sub>Re</sub>	83), Fig. 3-2
pBS- <i>ldhD</i>	pBluescript II KS <sup>+</sup> derivative; <i>ldhD</i> gene of <i>Lb. acetotolerans</i> HT	This study (Chapter 2)
pRKmAX- <i>ldhD</i>	pBBR1MCS-2 derivative; <i>ldhD</i> gene of <i>Lb. acetotolerans</i> HT	This study
pTV118NpctC1(STQK)ABdP <sub>Re</sub>	pTV118N derivative; P <sub>lac</sub> , <i>pct</i> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>phaA</i> , <i>phaB</i> , T <sub>Re</sub>	This study, Fig. 3-3
pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP <sub>Re</sub>	pTV118N derivative; P <sub>lac</sub> , <i>pct</i> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>ldhD</i> , <i>phaA</i> , <i>phaB</i> , T <sub>Re</sub>	This study, Fig. 3-4

Ap<sup>r</sup>, ampicillin resistance gene; Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance gene

### 3-2-2 組換えプラスミドの構築

以下に詳記するように、I. pRKmAX-*ldhD*、II. pTV118NpctC1(STQK)ABdP<sub>Re</sub> (Fig. 3-3)、III. pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> (Fig. 3-4) を構築した。使用したプライマーを Table 3-2 に示す。

#### I. pRKmAX-*ldhD* の構築

*lac* プロモーター支配下で導入遺伝子 *ldhD* を発現するように設計したプラスミドを以下の手順で構築した。

pBluescript II KS<sup>+</sup> に *Lb. acetotolerans* HT の *ldhD* が挿入されたプラスミド pBS-*ldhD* (第 2 章 2-2-6 参照) を *ApaI* と *XhoI* で消化し、*ldhD* 遺伝子の SD 配列から終始コドンまでを含む 1.0-kb *ApaI*-*XhoI* 断片を QIAGEN II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてゲルから切り出し、精製後、pBBR1MCS-2 の *ApaI* および *XhoI* 部位に挿入して pRKmAX-*ldhD* を得た。構築したプラスミドは、制限酵素処理により、インサートチェックを行った。

#### II. pTV118NpctC1(STQK)ABdP<sub>Re</sub> の構築

*lac* プロモーター支配下で導入遺伝子 *pct*、*phaC1*(STQK)、*phaA*<sub>Re</sub> および *phaB*<sub>Re</sub> を発

現するように設計したプラスミドを以下の手順で構築した。

pTV118NpctC1(STQK)AB (Fig. 3-2) から *R. eutropha* 由来のプロモーター (P<sub>Re</sub>) を取り除くため、プロモーター領域の外側の位置の配列からプライマー phaC1(STQK)(UP)-f1 および pct(DS)-r1 を設計し (Table 3-2)、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa) により inverse PCR を行った (Tables 3-3 and 3-4)。得られた約 8.7-kb の増幅産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製後、T4 Polynucleotide Kinase (Toyobo) を用いてリン酸化 (kination) した。その後、セルフライゲーションを行って、pTV118NpctC1(STQK)ABdP<sub>Re</sub> を得た。構築したプラスミドは、制限酵素処理により、P<sub>Re</sub> が取り除かれたことを確認した。

### III. pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub>

*lac* プロモーター支配下で導入遺伝子 *pct*、*phaC1(STQK)*、*ldhD*、*phaA*<sub>Re</sub> および *phaB*<sub>Re</sub> を発現するように設計したプラスミドを以下の構築手順で作製した。

*Lb. acetotolerans* HT のゲノムを鋳型として *ldhD* 遺伝子領域を増幅するプライマー ldhD-UP(PstI)-f および ldhD-PstI(TAA)-r (Table 3-2) を用いて PrimeSTAR HS DNA Polymerase により PCR を行い (Tables 3-5 and 3-6)、両端に *PstI* 部位を付加した *ldhD* 遺伝子を含む 1.0-kb の増幅産物を得た。この増幅産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製後、Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (TaKaRa) を用いて dA を付加し T-vector pMD20 に挿入した。このプラスミドを *PstI* で処理し、アルカリフォスファターゼ処理を行った pTV118NpctC1(STQK)ABdP<sub>Re</sub> の *PstI* 部位に挿入し、pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> を得た。構築したプラスミドは、コロニーPCR、あるいは制限酵素処理によってインサートチェックを行い、DNA シークエンシングによりインサートの向きをチェックした。

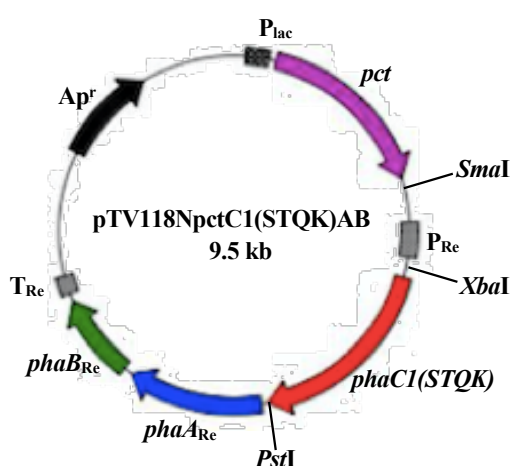


Fig. 3-2 pTV118NpctC1(STQK)AB (Taguchi et al., 2008)<sup>83)</sup>

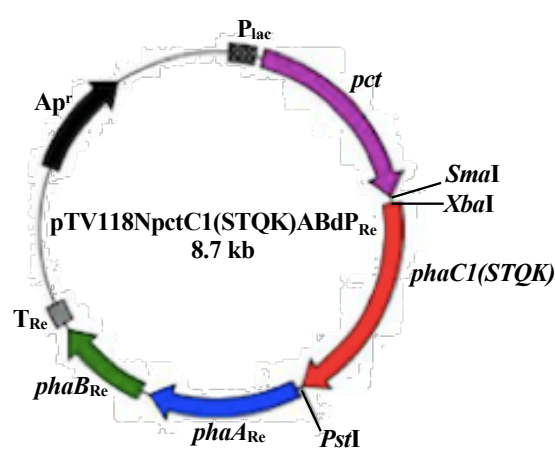
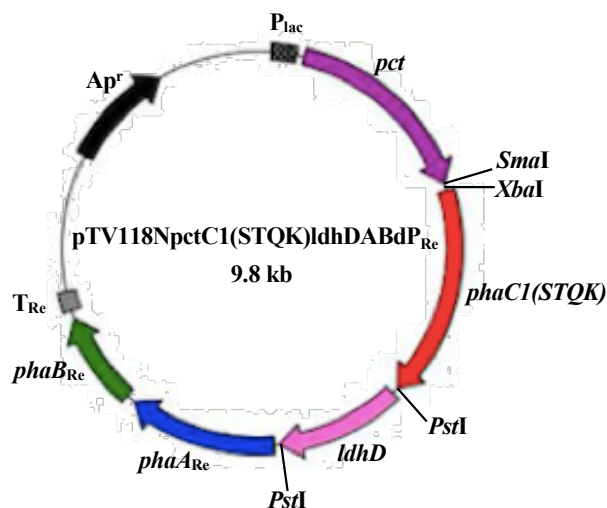


Fig. 3-3 pTV118NpctC1(STQK)ABdP<sub>Re</sub>



**Fig. 3-4** pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub>

**Table 3-2 Primers used in this study**

Primer	Sequence
phaC1(STQK)(UP)-f1	5'-GAATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAA-3'
pct(DS)-r1	5'-CCCGGGATCCGGTTATTTTTTCAGTCCCAT-3'
ldhD-UP(PstI)-f	5'-AACTGCAG* AAGGGTCATATCATTATTTTTTTGGGAGG-3'
ldhD-PstI(TAA)-r	5'-AACTGCAG* GAATAGAAAATTATGCATCTAA-3'

\**PstI* recognition site,

**Table 3-3 Components of reaction mixture**

Components	Volume ( $\mu$ L)	Final Concentration
5 $\times$ PrimeSTAR buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	10	1 $\times$
2.5 mM dNTP	4	0.2 mM each
phaC1(STQK)(UP)-f1 (10 $\mu$ M)	1.5	0.3 mM
pct(DS)-r1 (10 $\mu$ M)	1.5	0.3 mM
pTV118NpctC1AB(STQK)dPRe (1 $\mu$ g/mL)	X	< 200 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 units/ $\mu$ L)	0.5	1.25 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 3-4 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	55°C	15 sec
Extend	72°C	10 min (to step 2 x 30)
	72°C	20 min
Cool	4°C	$\infty$

**Table 3-5 Components of reaction mixture**

Components	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Final Concentration
5 $\times$ PrimeSTAR buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ plus)	10	1 $\times$
2.5 mM dNTP	4	0.2 mM each
phaC1(STQK)(UP)-f1 (10 $\mu\text{M}$ )	1.5	0.3 mM
pct(DS)-r1 (10 $\mu\text{M}$ )	1.5	0.3 mM
Template DNA	X	< 200 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 units/ $\mu\text{L}$ )	0.5	1.25 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 3-6 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94 $^{\circ}\text{C}$	3 min
Denature	98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec
Anneal	55 $^{\circ}\text{C}$	15 sec
Extend	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min (to step 2 x 30)
Cool	4 $^{\circ}\text{C}$	$\infty$

### 3-2-3 共重合ポリエステルの生合成

HT株の *ldhD* 遺伝子の*E. coli*への導入がD-乳酸生産量と合成されたポリマーのLA分率に与える影響を調べるため、構築したプラスミド pRKmAX-*ldhD* を、ポリマー生合成関連酵素遺伝子を保持するプラスミド pTV118NpctC1(STQK)AB<sup>83)</sup>とともに*E. coli* DH5 $\alpha$ 株に導入し、組換え株を作製した。300 mL 容三角フラスコを用いて、静置 (0 strokes/min) または振とう (60 and 100 strokes/min) 培養を行った。作製した組換え株を前培養培地である 1.5 mL の LB 培地 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリン、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  カナマイシン含有) に植菌し、30 $^{\circ}\text{C}$  で振とう培養を行った。約 15 時間培養後、本培養培地である 100 mL LB 培地 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリン含有、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  カナマイシン含有) に組換え株をそれぞれ 1% (v/v) 接種し、30 $^{\circ}\text{C}$  で静置または振とう培養を行った。8 時間培養後、終濃度が 2% (w/v) となるように 20% グルコースを添加し、48 時間 (総時間) 培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収し、凍結乾燥機で乾燥させた。菌体内のポリマー蓄積率とモノマー組成はガスクロマトグラフィー (GC) により調べた<sup>109)</sup>。ポリマーをメタノリシスによって、モノマーをメチルエステル化し、ガスクロマトグラフ装置に GC-17A (Shimadzu) を、カラムに InertCap 1 (0.25 mm I.D  $\times$  30 m, 0.4 mm; GL Sciences) を用いて水素イオン化検出器 (FID) により検出した (Appendix-2 参照)。また、D-Lactic acid/L-Lactic acid F-キット (Roche) を用いて培養液上清の D-乳酸濃度を測定した。

次に、さまざまな*E. coli*を宿主とし、*ldhD* 遺伝子導入による合成されたポリマーの LA 分率向上の効果を調べるため、構築したプラスミド pTV118NpctC1(STQK)ABdP<sub>Re</sub> および pTV118NpctC1(STQK)*ldhD*ABdP<sub>Re</sub> をそれぞれ*E. coli* DH5 $\alpha$ 、XL1-Blue および LS5218 に導入した。組換え株を、300 mL 容三角フラスコ (培地量 100 mL) を



用いた 100 strokes/min 振とう条件において、上記と同様に培養した。そして、菌体内のポリマー蓄積率とモノマー組成を調べた。

### 3-3 結果および考察

HT 株の *ldhD* 遺伝子導入による乳酸ベースポリマーP(LA-co-3HB)の LA 分率に与える影響を調べるため、pRKmAX-*ldhD* を、ポリマー生合成関連酵素遺伝子を保有するプラスミド pTV118NpctC1(STQK)AB とともに大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入し、0、60 および 100 strokes/min とさまざまな振とう条件において培養した。振とう数が少ないほど、より嫌氣的になると考えられる。組換え株を培養後、菌体内のポリマー組成と培養液上清の D-乳酸濃度を調べた。その結果を Table 3-7 に示す。100 strokes/min での振とう培養の場合、pTV118NpctC1(STQK)AB のみを導入した組換え株の培養液上清に D-乳酸は検出されなかったが (<0.01 g/L)、pTV118NpctC1(STQK)AB および pRKmAX-*ldhD* を導入した組換え株は 0.13 g/L の D-乳酸を生産した (Fig. 3-5)。さらに、LA 分率を比較すると、DH5 $\alpha$ /pTV118NpctC1(STQK)AB (9.8 mol%) よりも DH5 $\alpha$ /pTV118NpctC1(STQK)AB and pRKmAX-*ldhD* (19.8 mol%) の方が高かった (Fig. 3-5)。このように、培養液中の D-乳酸濃度が高まると、P(LA-co-3HB)の LA 分率も向上する傾向がみられた。これは、HT 株の *ldhD* 遺伝子を導入して発現した D-LDH によって、D-乳酸の生産量が向上したため、ポリマー鎖中の LA 分率が高まったと考えられる。

DH5 $\alpha$ /pTV118NpctC1(STQK)AB and pRKmAX-*ldhD* において、60 strokes/min の振とう培養 (1.49 g/L) よりも、より嫌氣的条件である静置 (0 strokes/min) 培養 (2.07 g/L) の方が、培地中の D-乳酸濃度が高かった (Fig. 3-6)。一方、P(LA-co-3HB)の LA 分率は静置培養 (36.6 mol%) と 60 strokes/min の振とう培養 (36.4 mol%) においてほぼ同等であった (Fig. 3-6)。すなわち、嫌氣的条件である静置で培養しても、ポリマー鎖の LA 分率の著しい向上はみられないことが明らかとなった。山田ら<sup>84)</sup>の研究において、*pflA* knockout mutant の大腸菌 JW0885 に pTV118NpctC1(STQK)AB を導入して作製した組換え株を窒素通気による嫌氣培養を行うと、組換え株は、菌体外に 5.7 g/L の D-乳酸を生産し、P(47% LA-co-3HB)を蓄積したが、ポリマーに導入された LA 量は微好氣的条件と比較して減少したことが明らかとなっている。この現象は、D-LA への CoA 供与体であるアセチル CoA が嫌氣的条件により減少したため、D-LA-CoA の生成量が減少したと推測されている。本研究においても、同様にアセチル CoA が減少したため、ポリマー鎖の LA 分率は向上しなかったものと考えられた。

3 種類の振とう培養条件において、DH5 $\alpha$ /pTV118NpctC1(STQK)AB and pRKmAX-*ldhD* により合成された P(LA-co-3HB)の LA 分率は、100 strokes/min の振とう培養 (19.8 mol%) よりも、静置培養 (0 strokes/min) (36.6 mol%) と 60 strokes/min の振とう培養 (36.4 mol%) の方が高かった。しかしながら、乾燥菌体重量とポリマー蓄積率は、100 strokes/min の振とう培養 (菌体量は 1.80 g/L、蓄積率は 45.3 wt%) よりも、静置培養 (0 strokes/min) (菌体量は 0.39 g/L、蓄積率は 33.5 wt%) と 60 strokes/min の振とう培養 (菌体量は 0.77 g/L、蓄積率は 40.5 wt%) の方が低かった。そのため、最終的に得られるポリマー量を比較すると、100 strokes/min の振とう培養 (0.82 g/L) は、静置培養 (0 strokes/min) (0.13 g/L) の約 6.3 倍、60 strokes/min の振とう培養 (0.31 g/L) の約

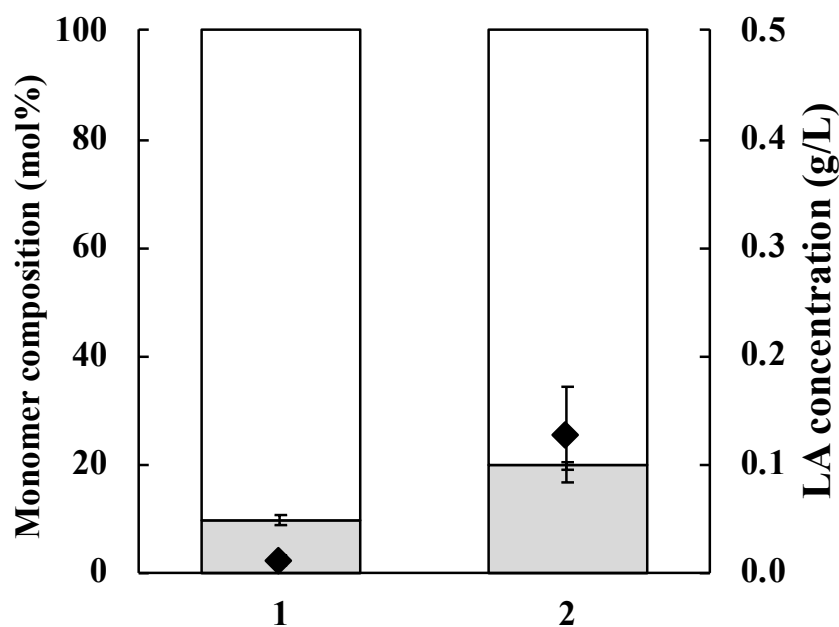
2.6 倍であった (Fig. 3-7)。このように、より嫌氣的に培養すると、乳酸生産量は増加するが、ポリマー生産量は減少する傾向がみられた。嫌気条件下において、大腸菌は D-乳酸生産量が増加するが、菌体の増殖は好気条件下と比較して減少する<sup>84, 110, 111</sup>)。また、改変 PHA 重合酵素 PhaC1(STQK)は、D-LA-CoA を重合することができるが、これまでに(R)-3HB-CoA などの PHA モノマー基質を合成経路に供給せずに乳酸ベースポリマーが合成された例はない<sup>81, 83, 84</sup>)。したがって、*ldhD* 遺伝子を導入した組換え株による P(LA-co-3HB)の合成において、ポリマーの生産量を考慮すると、十分な細胞増殖と(R)-3HB-CoA の供給があり、ポリマー鎖への LA ユニットの取り込みがみられた 100 strokes/min の振とう培養が適していることがわかった。

次に、*R. eutropha* 由来のプロモーター ( $P_{Re}$ ) を除いた pTV118NpctC1(STQK)ABdP $_{Re}$  と、それに HT 株の *ldhD* 遺伝子を挿入した pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP $_{Re}$  を大腸菌 DH5 $\alpha$  株、XL1-Blue 株および LS5218 株に導入し、100 strokes/min の振とう培養を行った。その結果、pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP $_{Re}$  を導入したすべての組換え株において、pTV118NpctC1(STQK)ABdP $_{Re}$  と比較して P(LA-co-3HB)の LA 分率が高まった (Table 3-8)。特に、XL1-Blue/pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP $_{Re}$  は、15.7 wt%の蓄積率で P(28.5% LA-co-3HB)を合成した。また、2 つのプラスミドが導入された DH5 $\alpha$ /pTV118NpctC1(STQK)AB and pRKmAX-*ldhD* は、45.3 wt%の蓄積率で P(19.8% LA-co-3HB)を合成したが、同遺伝子を 1 つのプラスミドで発現させた DH5 $\alpha$ /pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP $_{Re}$  は、7.6 wt%の蓄積率で P(14.3% LA-co-3HB)を合成した (Tables 3-7 and 3-8)。pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP $_{Re}$  は pTV118NpctC1(STQK)AB から、*phaC1(STQK)*遺伝子上流に位置する  $P_{Re}$  を除去し、*ldhD* 遺伝子を挿入することにより構築した。したがって、このプラスミドの違いは、*phaC1(STQK)*遺伝子を含むこれらの遺伝子の発現レベルに影響を与え、それゆえ 2 つのプラスミドを導入した組換え株の方が合成された乳酸ベースポリマーの方が、蓄積率が大幅に高まったと推定された。このように、pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP $_{Re}$  導入株は、ポリマー蓄積率が低下したが、1 つのプラスミドに乳酸ベースポリマー合成関連酵素遺伝子がすべて挿入されているため、別の遺伝子を挿入したプラスミドとともに大腸菌へ導入することができ、さらに、*lac* プロモーター支配下のみで P(LA-co-3HB)合成関連酵素遺伝子すべてを発現するため、将来的には乳酸菌を宿主とするプラスミドを構築するための鋳型にすることができる。

**Table 3-7 P(LA-co-3HB) production by the recombinant strains of *E. coli* DH5 $\alpha$** 

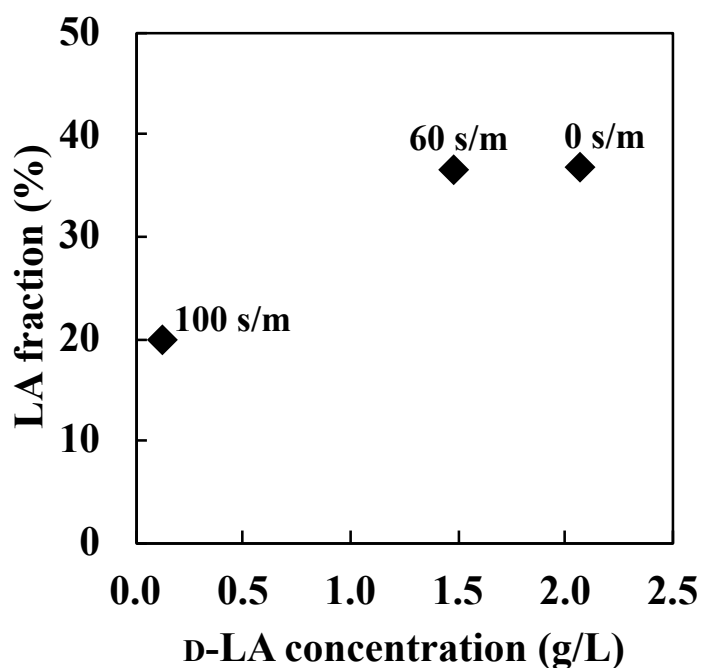
Plasmid	Shaking speed (strokes/min)	Dry cell weight (g/L)	Polymer content (wt%)	Polymer composition (mol%)		D-LA concentration (g/L)	Final pH
				LA (C3)	3HB (C4)		
pTV118NpctC1(STQK)AB	0	0.35 $\pm$ 0.02	22.5 $\pm$ 5.0	29.6 $\pm$ 0.9	70.4 $\pm$ 0.9	1.93 $\pm$ 0.01	4.77 $\pm$ 0.09
	60	0.55 $\pm$ 0.17	31.7 $\pm$ 4.8	30.0 $\pm$ 0.9	70.0 $\pm$ 0.9	1.35 $\pm$ 0.04	4.80 $\pm$ 0.08
	100	1.30 $\pm$ 0.05	46.9 $\pm$ 3.3	9.8 $\pm$ 0.9	90.2 $\pm$ 0.9	0.01 $\pm$ 0.00	4.94 $\pm$ 0.06
pTV118NpctC1(STQK)AB and pRKmAX-ldhD	0	0.39 $\pm$ 0.03	33.5 $\pm$ 4.1	36.6 $\pm$ 1.3	63.4 $\pm$ 1.3	2.07 $\pm$ 0.06	4.70 $\pm$ 0.08
	60	0.77 $\pm$ 0.06	40.5 $\pm$ 5.3	36.4 $\pm$ 0.4	63.6 $\pm$ 0.4	1.49 $\pm$ 0.05	4.74 $\pm$ 0.08
	100	1.80 $\pm$ 0.11	45.3 $\pm$ 0.6	19.8 $\pm$ 0.8	80.2 $\pm$ 0.8	0.13 $\pm$ 0.04	4.87 $\pm$ 0.05

Cells were cultivated at 30°C for 48 h in a 300-mL conical flask containing 100 mL of LB medium. 2% (w/v) glucose was added to the medium after 8 h of cultivation.

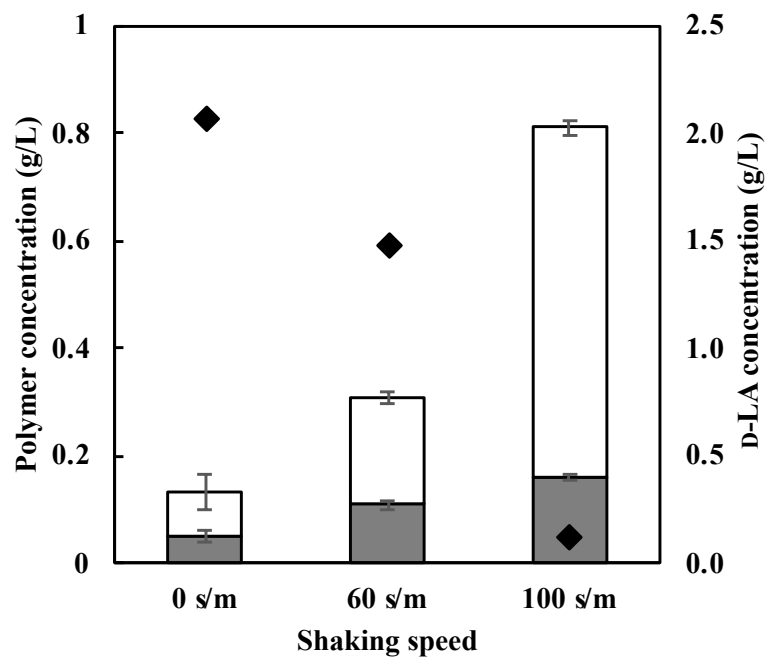


**Fig. 3-5 P(LA-co-3HB) production by the recombinant strains of *E. coli* DH5a.**

Cells were cultivated at 30°C for 48 h at shaking speed of 100 strokes/min in a 300-mL conical flask containing 100 mL of LB medium. 2% (w/v) glucose was added to the medium after 8 h of cultivation. 1, pTV118NpetC1(STQK)AB; 2, pTV118NpetC1(STQK)AB and pRKmAX-ldhD; Diamond, D-LA concentration; white bar, 3HB unit in the polymer; gray bar, D-LA unit in the polymer.



**Fig. 3-6 Relationship between the D-LA concentration in the culture supernatant and LA molar fraction of P(LA-co-3HB)s accumulated in the the recombinant strain of *E. coli* DH5a harboring pTV118NpetC1(STQK)AB and pRKmAX-ldhD.**



**Fig. 3-7 Polymer concentration of *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTV118NpctC1(STQK)AB and pRKmAX-ldhD.**

Diamond, D-LA concentration in the culture supernatant; white bar, 3HB unit concentration; gray bar, LA unit concentration.

**Table 3-8 P(LA-co-3HB) production by the recombinant strains of *E. coli*.**

Strain	Plasmid	Dry Cell Weight (g/L)	Polymer content (wt%)	Polymer composition ( mol %)	
				LA (C3)	3HB (C4)
DH5 $\alpha$	pTV118NpctC1(STQK)ABdP <sub>Re</sub>	1.37 $\pm$ 0.22	5.6 $\pm$ 6.1	trace	100
	pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP <sub>Re</sub>	1.05 $\pm$ 0.22	7.6 $\pm$ 3.2	14.3 $\pm$ 1.9	85.7 $\pm$ 1.9
XL1-Blue	pTV118NpctC1(STQK)ABdP <sub>Re</sub>	2.19 $\pm$ 0.40	36.7 $\pm$ 3.9	6.7 $\pm$ 2.1	93.3 $\pm$ 2.1
	pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP <sub>Re</sub>	1.18 $\pm$ 0.02	15.7 $\pm$ 2.5	28.5 $\pm$ 5.6	71.5 $\pm$ 5.6
LS5218	pTV118NpctC1(STQK)ABdP <sub>Re</sub>	1.93 $\pm$ 0.13	8.5 $\pm$ 0.6	5.7 $\pm$ 1.9	94.3 $\pm$ 1.9
	pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP <sub>Re</sub>	1.48 $\pm$ 0.12	4.4 $\pm$ 0.7	15.7 $\pm$ 3.5	84.3 $\pm$ 3.5

Cells were cultivated at 30°C for 48 h at a shaking speed of 100 strokes/min in a 300-mL conical flask containing 100 mL of LB medium. 2% (w/v) glucose was added to the medium after 8 h of cultivation.

### 3-4 小括

本章では、*Lb. acetotolerans* HT の *ldhD* 遺伝子を利用し、大腸菌を宿主として乳酸ベースポリマーP(LA-co-3HB)の LA 分率を向上させることを目的した。

ポリマー生合成関連酵素遺伝子を保有するプラスミド pTV118NpctC1(STQK)AB と HT 株の *ldhD* 遺伝子を挿入したプラスミド pRKmAX-*ldhD* を導入した組換え大腸菌 DH5 $\alpha$  株を作製し、乳酸ベースポリマーP(LA-co-3HB)の合成を行った (Table 3-7)。100 strokes/min の振とう培養の結果、pTV118NpctC1(STQK)AB とともに pRKmAX-*ldhD* を保持する組換え株は、それを有さない株と比べて、培養液中の D-乳酸濃度とポリマー鎖中の LA 分率が高まった (Fig. 3-5)。*ldhD* 遺伝子導入により、微好氣的な条件においても D-LDH が発現し D-乳酸が生産され、それにともないポリマー鎖中の LA 分率も向上したと考えられる。さらに、0 および 60 strokes/min と、より嫌氣度を高めて培養した結果、組換え株が生産した D-乳酸濃度は向上したが、ポリマー鎖中の LA 分率がさらに高まることはなかった (Fig. 3-6)。嫌氣的条件により CoA 供与体のアセチル CoA の生成量が減少したためと考えられる。また、嫌氣的に培養すると菌体量とポリマー蓄積率が減少し、それによって最終的なポリマー生産量も減少した (Fig. 3-7)。嫌氣的に培養すると、好氣条件下と比較して細菌の増殖速度は減少し、さらに生産された乳酸による生育阻害により生菌数は低下する。したがって、ポリマーの生産量と LA 分率を考慮すると、微好氣的条件下で培養することが乳酸ベースポリマーの合成に適していると結論した。

*lac* プロモーター支配下でポリマー生合成関連酵素遺伝子を発現するように設計した pTV118NpctC1(STQK)ABdP<sub>Re</sub>、さらに、それに HT 株の *ldhD* 遺伝子を挿入した pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> を構築した。それぞれを大腸菌 3 株へ導入し、100 strokes/min の振とう培養を行った。その結果、すべての組換え株において P(LA-co-3HB) が合成され、pTV118NpctC1(STQK)ABdP<sub>Re</sub> 導入株よりも pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> 導入株の方が、ポリマー鎖中の LA 分率が高まった。したがって、さまざまな大腸菌において、*ldhD* 遺伝子導入による LA 分率向上の効果が示された。この方法により、*pflA* knockout mutant の大腸菌を宿主として使用することなく、LA 分率を高めた乳酸ベースポリマーの合成が可能となった。

PLA に近い共重合ポリマーを効率よく合成するために、ポリマーの LA 分率と菌体量を高めなければならないが、大腸菌を宿主とした場合、菌体量を維持したままで、ポリマー鎖中の LA 分率を高めることは難しい。一方、乳酸発酵でエネルギーを得る乳酸菌を宿主とした場合、菌体量が低下せずに LA 分率が高い乳酸ベースポリマーが合成できると予想している。また、大腸菌はグラム陰性菌であるため、エンドトキシンなどの安全性の面で懸念がある。乳酸菌はグラム陽性菌であり、安全性の面からみても有用な宿主候補である。本章で構築したプラスミドは乳酸菌由来の *ldhD* 遺伝子を保持しており、*lac* プロモーター支配下でポリマー生合成関連酵素遺伝子を発現する。そのため、本研究成果により、乳酸菌に適したプラスミドを構築するなどの研究



展開が今後期待される。

## 第四章

### 大腸菌を宿主とした 新規乳酸ベースコポリマーの合成

## 4-1 緒言

今日、プラスチックは日常生活において袋、フィルム、シート、容器など多様な分野で利用されているが、それぞれ求められる物性が異なる。そのため、生分解性プラスチックが汎用化されるには、利用目的に応じたさまざまな特性を有する多様な素材の開発が必要である。微生物系の生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、モノマー組成により物性が異なることが知られている。例えば、代表的な PHA であるポリ-(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸 P(3HB)ホモポリマーは硬くて脆い性質を有するが、*Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株が合成した 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) と中鎖長(*R*)-3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) とのランダム共重合体 P(94% 3HB-co-3HA)は、レジ袋などに利用される低密度ポリエチレン (LDPE) と同等の柔軟性を示す丈夫な高分子材料である<sup>75)</sup>。このように、P(3HB)のポリマー鎖に中鎖長 3HA が導入されると結晶化度が低下し、柔軟性を持つようになる。しかしながら、PHA は一般的に不透明である。

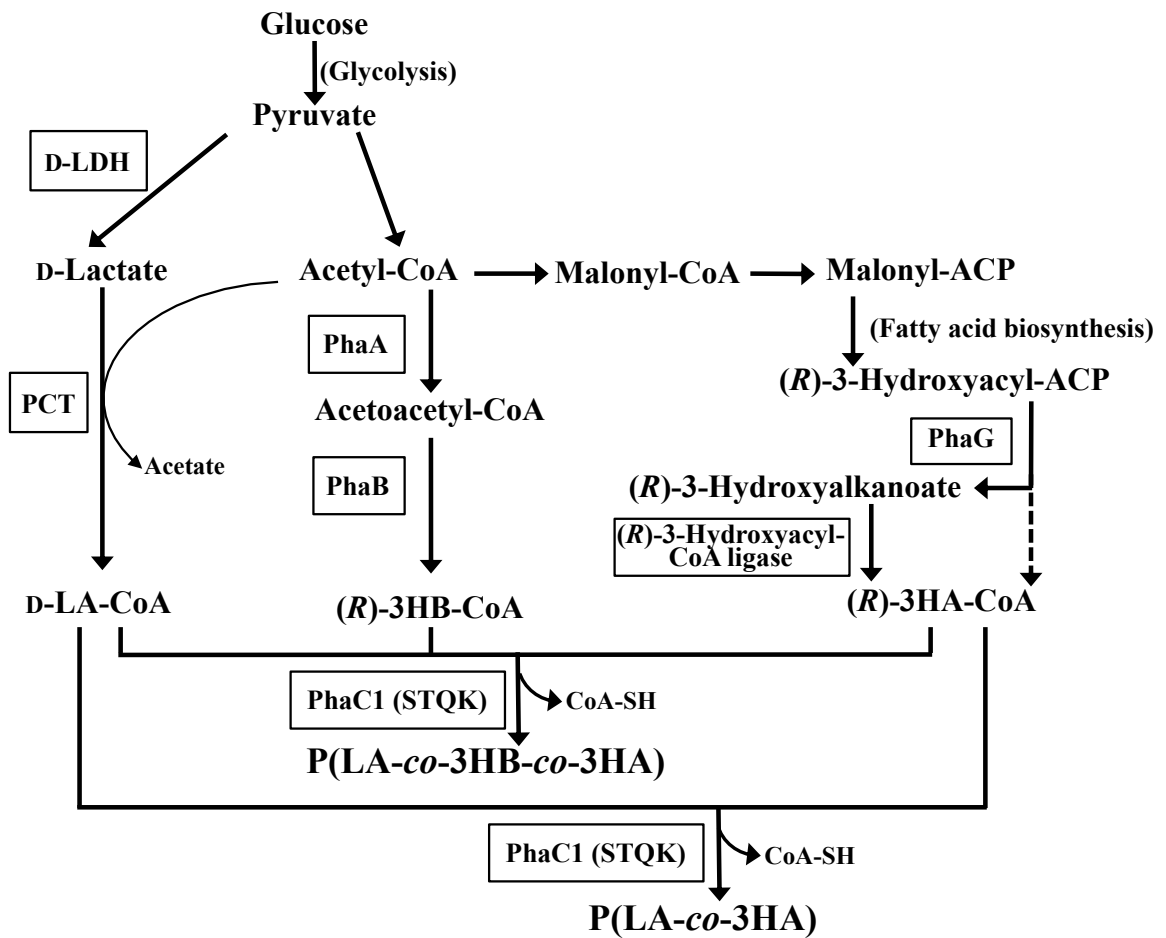
一方で、化学合成系生分解性プラスチックのポリ乳酸 (PLA) は、優れた透明性を有するが、硬質であるため、使用範囲が限られる。これまでに、PLA の低い柔軟性を解決するために、グリコール酸の二量体 (グリコリド)、カプロラクトンや炭酸トリメチレンなどとの共重合により結晶性を低下させ、その力学的強度を制御する試みが行われている<sup>27, 112)</sup>。

一般的に、PLA は、微生物発酵で得られた乳酸を原料として、ラクチドを経由した多段階プロセスにより合成される。近年、PHA 生合成システムを利用した PLA 様プラスチックの生合成が検討されている。これは、乳酸 (LA) ユニットを含む生分解性プラスチック (乳酸ベースポリマー) を、改変 PHA 重合酵素を用いて、微生物培養の一段階プロセスによって合成する研究であるが、実用化には至っていない。実用化に向けて、生産コストを削減することや、硬いものから柔らかいものなど、さまざまな特性を有するポリマーを合成することが重要である。そこで、これまでに、LA および 3HB ユニットに加え、第 3 のモノマーユニットを導入した乳酸ベースポリマーの合成が試みられている。例えば、大腸菌において炭素源のグルコースの他に、(*R*)-3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) の前駆体としてプロピオン酸を培地に添加することにより、乳酸ベースターポリマー (三元共重合体) の P(LA-co-3HB-co-3HV)が合成されている<sup>90)</sup>。また、グルコースとブタン酸から  $\beta$  酸化経路とその逆反応を介して LA、3HB および (*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸 (3HHx) ユニットからなる P(LA-co-3HB-co-3HHx)が合成されている<sup>91)</sup>。しかしながら、このようなさまざまなモノマー組成を有する乳酸ベースポリマーについての報告は少ない。したがって、本研究では、新規組成の乳酸ベースポリマーを合成することを目的とし、第 3 のモノマーユニットとして、ポリマーに柔軟性を付与すると予測される中鎖長 3HA ユニットを選択した。

これまでに、脂肪酸合成経路からの中鎖長 3HA ユニットの供給に関わる(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (*phaG*) がクローニングされてい

る<sup>65)</sup>。その後、この PhaG 酵素は、トランスフェラーゼ活性よりもチオエステラーゼ活性の方が高く、脂肪酸合成経路からの(R)-3-ヒドロキシアシル ACP の多くが(R)-3-ヒドロキシアシルアルカン酸として遊離していることが報告された<sup>67)</sup>。したがって、3HA ユニットをポリマー鎖へ導入するためには、(R)-3-ヒドロキシアシルアルカン酸から(R)-3-ヒドロキシアシル CoA ((R)-3HA-CoA) を生成する(R)-3HA-CoA リガーゼが必要であった。最近、PHA 生合成酵素遺伝子と、*phaG* 遺伝子および(R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子が大腸菌に導入することにより、糖を唯一の炭素源として P(3HB-*co*-3HA)が合成された<sup>68,79)</sup>。本章では、この経路を利用して、新規乳酸ベースポリマーP(LA-*co*-3HB-*co*-3HA) および P(LA-*co*-3HA)の合成経路を構築する (Fig. 4-1)。

構築した合成経路に関する酵素は、D-LA-CoA を供給する D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) およびプロピオニル CoA トランスフェラーゼ (PCT)、(R)-3HB-CoA を供給する  $\beta$ -ケトチオラーゼおよび NADPH 依存性アセトアセチル CoA リダクターゼ (PhaA および PhaB)、中鎖長(R)-3HA-CoA を脂肪酸合成経路から供給する(R)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼ (PhaG) および(R)-3HA-CoA リガーゼ、そして、モノマーを重合する改変 PHA 重合酵素 (PhaC1(STQK)) である。D-LDH 遺伝子として、第二章においてクローニングし、第三章において P(LA-*co*-3HB)合成に利用した *Lactobacillus acetotolerans* HT の *ldhD* 遺伝子を用いた。また、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の *phaG* 遺伝子、*Pseudomonas aeruginosa* PAO 由来の(R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子 (PA3924)<sup>68)</sup>を用いた。これまでに、糖を唯一の炭素源とし、大腸菌を宿主とした乳酸ベースポリマーP(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)および P(LA-*co*-3HA)の合成についての報告はなく、初めての試みである。



**Fig. 4-1 Metabolic control for the synthesis of P(LA-co-3HB-co-3HA) and P(LA-co-3HA) from glucose.**

D-LDH, D-lactate dehydrogenase; PCT, propionyl-CoA transferase; PhaA,  $\beta$ -ketothiolase; PhaB NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; PhaG, (R)-3-hydroxyacyl-ACP thioesterase; PhaC1(STQK), engineered PHA synthase of *Pseudomonas* sp. 61-3.

## 4-2 実験操作

### 4-2-1 使用した菌株およびプラスミド

以下の菌株およびプラスミドを用いて研究を行った (Table 4-1)。

**Table 4-1 Strains and plasmids used in this study**

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ( r <sub>Km</sub> <sup>r</sup> ), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argFV169</i> ), $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> M15, F <sup>-</sup>	Clontech
<i>E. coli</i> LS5218	<i>fadR601</i> , <i>atoC2</i> (Con)	107)
<i>E. coli</i> CAG18497	<i>fadR13::Tn10</i>	113)
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3	Wild strain	JCM 10015
Plasmids		
T-vector pMD20	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap <sup>r</sup> , <i>lacPOZ</i> , SP promoter	TaKaRa
pUC118 <i>HincII</i> /BAP	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap <sup>r</sup> , <i>lacPOZ</i> , <i>lac</i> promoter	TaKaRa
pBBR1MCS-2	Km <sup>r</sup> , broad host range, <i>lacPOZ</i>	108)
pBBR1MCS-3	Tc <sup>r</sup> , broad host range, <i>lacPOZ</i>	108)
pRTcASc-MCL(Pa)	pBBR1MCS-3 derivative; P <sub>lac</sub> , PA3924 from <i>P. aeruginosa</i> PAO	68)
pRTcAA-GMCL(Pa)	pBBR1MCS-3 derivative; P <sub>lac</sub> , PA3924, <i>phaG</i> <sub>Ps</sub>	This study
pRKmXS-GMCL(Pa)	pBBR1MCS-2 derivative; P <sub>lac</sub> , PA3924, <i>phaG</i> <sub>Ps</sub>	This study
pTV118NpctC1(STQK)ABdP <sub>Re</sub>	pTV118N derivative; P <sub>lac</sub> , <i>pct</i> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>phaA</i> , <i>phaB</i> , T <sub>Re</sub>	This study (Chapter 3)
pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP <sub>Re</sub>	pTV118N derivative; P <sub>lac</sub> , <i>pct</i> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>ldhD</i> , <i>phaA</i> , <i>phaB</i> , T <sub>Re</sub>	This study (Chapter 3)
pTV118NpctC1(STQK)ldhD	pTV118N derivative; P <sub>lac</sub> , <i>pct</i> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>ldhD</i> , T <sub>Re</sub>	This study, Fig. 4-2

Ap<sup>r</sup>, ampicillin resistance gene; Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance gene; Tc<sup>r</sup>, tetracycline resistance gene

### 4-2-2 菌株の保存

*Pseudomonas* sp. 61-3 は LB 寒天平板培地で、28°C、一晚培養した後、4°C で保存する。3 週間を目安に新しい培地に植え継ぎを行った。*E. coli* については、第 2 章 2-2-2 参照。

### 4-2-3 組換えプラスミドの構築

以下に詳述するように、I. pRTcAA-GMCL(Pa)、II. pRKmXS-GMCL(Pa)、III. pTV118NpctC1(STQK)ldhD (Fig. 4-2) を構築した。使用したプライマーを Table 4-2 に示す。

### I. pRTcAA-GMCL(Pa)

*lac* プロモーター支配下で *phaG<sub>Ps</sub>* 遺伝子および *Pseudomonas aeruginosa* PAO 由来の PA3924 を発現するように設計したプラスミドを以下の操作手順で作製した。

*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA を鋳型とし、*phaG<sub>Ps</sub>* 遺伝子を増幅するプライマー *phaG*-SD(*Apal*)-f および *phaG*-SD(*Apal*)-r (Table 4-2) を用いて PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa) により PCR (Tables 4-3 and 4-4) を行った。得られた約 1.0-kb の増幅産物を、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (TaKaRa) を用いて dA 付加後、T-vector pMD20 に挿入した。このプラスミドを *Apal* で処理し、アルカリフォスファターゼ処理を行った pRTcASc-MCL(Pa)の *Apal* 部位に挿入し、pRTcAA-GMCL(Pa)を得た。構築したプラスミドは、コロニーPCR、あるいは制限酵素処理によってインサートチェックを行い、DNA シークエンシングによりインサートの向きをチェックした。

### II. pRKmXS-GMCL(Pa)

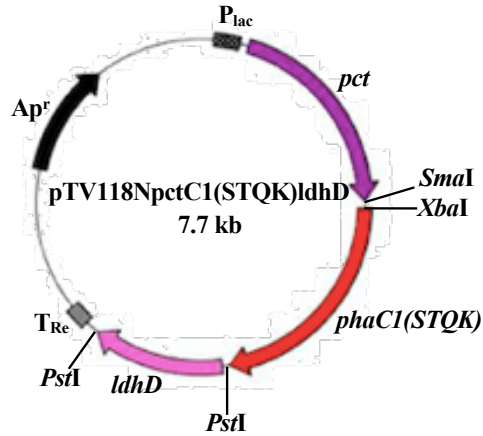
*lac* プロモーター支配下で *phaG<sub>Ps</sub>* 遺伝子および PA3924 を発現するように設計したプラスミドを以下の操作手順で作製した。

プラスミド pRTcAA-GMCL(Pa)を鋳型として、*phaG<sub>Ps</sub>* 遺伝子および PA3924 を増幅するプライマー *phaG*-SD(*XhoI*)-f および MCL-*SacI*-r(PAO) (Table 4-2) を用いて PrimeSTAR HS DNA Polymerase により PCR を行った (Tables 4-5 and 4-6)。得られた約 3.0-kb の増幅産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製し、Mighty Cloning Reagent Set <Blunt End> (TaKaRa) を用いた Blunting Kination 反応後、pUC118 *HincII*/BAP に挿入した。このプラスミドを *SacI*、*XhoI* で処理し、アルカリフォスファターゼ処理を行った pBBR1MCS-2 の *SacI*、*XhoI* 部位に挿入し、pRKmXS-GMCL(Pa)を得た。構築したプラスミドは、コロニーPCR、あるいは制限酵素処理によってインサートチェックを行い、DNA シークエンシングによりインサートの向きをチェックした。

### III. pTV118NpctC1(STQK)ldhD

*lac* プロモーター支配下で導入遺伝子 *pct*、*phaC1*(*STQK*)および *ldhD* を発現するように設計したプラスミドを以下の構築手順で作製した。

pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> (第3章 3-2-2 参照、Fig. 3-4) から *phaA<sub>Re</sub>* および *phaB<sub>Re</sub>* 遺伝子を取り除くため、*phaAB<sub>Re</sub>* 遺伝子領域の外側の位置の配列からプライマー *phbB*(*Re*)DS-f1 および *ldhD*-PstI(TAA)-r を設計し (Table 4-2)、PrimeSTAR HS DNA Polymerase により inverse PCR を行った (Tables 4-7 and 4-8)。得られた約 7.8-kb の増幅産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製後、T4 Polynucleotide Kinase (Toyobo) を用いてリン酸化 (kination) した。その後、セルフライゲーションを行って、pTV118NpctC1(STQK)ldhD を得た (Fig. 4-2)。構築したプラスミドは、コロニーPCR、あるいは制限酵素処理によってインサートチェックを行い、DNA シークエンシングによりインサートの向きをチェックした。



**Fig. 4-2 pTV118NpctC1(STQK)ldhD**

**Table 4-2 Primers used in this study**

Primer	Sequence
phaG-SD(ApaI)-f	5'-GGGCCC <sup>a)</sup> GCATACCCGCTTGCCAGGAGT-3'
phaG-DS(ApaI)-r	5'-GGGCCC <sup>a)</sup> TGATCCTTAGGAGCGCGAGGTT-3'
phaG-SD(XhoI)-f	5'-CTCGAG <sup>b)</sup> CATACCCGCTTGCCAGGAGT-3'
MCL-SacI-r(PAO)	5'-GAGCTC <sup>c)</sup> GTGTAGGAAAGCCCCGTCAGACGG-3'
phbB(Re)DS-fl	5'-GCCTGGTTCAACCAGTCGG-3'
ldhD-PstI(TAA)-r	5'-AACTGCAG <sup>d)</sup> GAATAGAAAATTATGCATCTAA-3'

<sup>a)</sup>*ApaI* recognition site, <sup>b)</sup>*XhoI* recognition site, <sup>c)</sup>*SacI* recognition site, <sup>d)</sup>*PstI* recognition site

**Table 4-3 Components of reaction mixture**

Components	Volume (μL)	Final Concentration
5×PrimeSTAR buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	10	1×
2.5 mM dNTP	4	0.2 mM each
phaG-SD(ApaI)-f (10 μM)	1.5	0.3 mM
phaG-DS(ApaI)-r (10 μM)	1.5	0.3 mM
Template DNA	X	< 200 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 units/μL)	0.5	1.25 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 4-4 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	55°C	5 sec
Extend	72°C	1 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	∞



**Table 4-5 Components of reaction mixture**

Components	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Final Concentration
5 $\times$ PrimeSTAR buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ plus)	10	1 $\times$
2.5 mM dNTP	4	0.2 mM each
phaG-SD(XhoI)-f (10 $\mu\text{M}$ )	1.5	0.3 mM
MCL-SacI-r(PAO1) (10 $\mu\text{M}$ )	1.5	0.3 mM
pRTcAA-GMCL(Pa)	X	< 200 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 units/ $\mu\text{L}$ )	0.5	1.25 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 4-6 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94 $^{\circ}\text{C}$	3 min
Denature	98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec
Anneal	55 $^{\circ}\text{C}$	5 sec
Extend	72 $^{\circ}\text{C}$	3 min (to step 2 x 30)
Cool	4 $^{\circ}\text{C}$	$\infty$

**Table 4-7 Components of reaction mixture**

Components	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Final Concentration
5 $\times$ PrimeSTAR buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ plus)	10	1 $\times$
2.5 mM dNTP	4	0.2 mM each
phbB(Re)DS-f1 (10 $\mu\text{M}$ )	1.5	0.3 mM
ldhD-PstI(TAA)-r (10 $\mu\text{M}$ )	1.5	0.3 mM
pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP <sub>Re</sub>	X	< 200 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 units/ $\mu\text{L}$ )	0.5	1.25 unit
滅菌水	Up to 50	

**Table 4-8 Thermal cycling condition**

	Temperature	Time
Preheat	94 $^{\circ}\text{C}$	3 min
Denature	98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec
Anneal	55 $^{\circ}\text{C}$	15 sec
Extend	72 $^{\circ}\text{C}$	8 min (to step 2 x 30)
Cool	4 $^{\circ}\text{C}$	$\infty$

#### 4-2-4 共重合ポリエステルの生合成

新規乳酸ベースポリマーP(LA-co-3HB-co-3HA)を合成するため、第3章で構築したプラスミド pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> とともに本章で構築したプラスミド pRTcAA-GMCL(Pa)あるいは pRkmXS-GMCL(Pa)を大腸菌に導入し、組換え株を作製した。大腸菌は DH5 $\alpha$  と、脂肪酸代謝の調節遺伝子 (*fadR*) の破壊株である LS5218 (*fadR601*, *atoC2*(Con)) および CAG18497 (*fadR13::Tn10*) を選択した。また、新規乳酸ベースポリマーP(LA-co-3HA)を合成するため、pTV118NpctC1(STQK)ldhD とともに pRTcAA-

GMCL(Pa)あるいは pRKmXS-GMCL(Pa)を大腸菌に導入した。

培養には 300 mL あるいは 500 mL 容三角フラスコを用いて、100 strokes/min の振とう培養を行った。作製した組換え株を前培養培地である 1.5 mL の LB 培地 (100 µg/mL アンピシリン、50 µg/mL カナマイシンまたは 12.5 µg/mL テトラサイクリン含有) に植菌し、30°C で振とう培養を行った。約 15 時間培養後、本培養培地である 100 または 300 mL LB 培地 (必要に応じて抗生物質を添加) に組換え株をそれぞれ 1% (v/v) 接種し、30°C で培養した。8 時間培養後、終濃度が 2% (w/v) となるように 20% グルコースを添加し、48 時間 (総時間) 培養した。培養後、菌体内のポリマー蓄積率とモノマー組成をガスクロマトグラフィー (GC) により調べた<sup>109)</sup> (Appendix-2 参照)。

#### 4-2-5 ポリエステルの性質と物性評価

組換え株のうち、*E. coli* LS5218/pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> and pRTcAA-GMCL(Pa) および *E. coli* CAG18497/pTV118NpctC1(STQK)ldhD and pRKmXS-GMCL(Pa) の乾燥菌体よりポリエステルを抽出し、その性質を調べるとともに物性評価を行った。合成したポリマーを乾燥菌体重量 6.48 または 5.73 g (平均ポリマー蓄積率 2.9 および 1.5 wt%) から 2 L のクロロホルムを用いて 48 時間抽出し、メタノールによる再沈殿を行い、精製した (Appendix-2 参照)。約 73.8 または 49.9 mg のポリマーが得られた。

分子量はゲル浸透クロマトグラフィー (gel-permeation chromatography, GPC) により分析した。GPC 測定には、検出器として示差屈折計 (RID-10A) を備えた Shimadzu 20A GPC システム (Shimadzu, Japan) を用いた。カラムは直列に接続した Shodex K-806M および K-802 を使用し、カラム温度 40°C で測定した。溶離液はクロロホルムを用い、0.8 mL/min の流速で分析を行った。また、分析試料は 1.0 mg/mL の濃度になるようにクロロホルムに溶解した。分子量は、ポリスチレン換算で計算した。

精製した乳酸ベースポリマーの正確なモノマー組成とモノマー連鎖を NMR (500 MHz <sup>1</sup>H-NMR および 125 MHz <sup>13</sup>C-NMR) 解析により調べた<sup>114,115)</sup>。溶媒は重クロロホルム、基準物質としてテトラメチルシラン (TMS) を用い、測定は室温で行った。

熱的特性は、冷却装置を備えた Perkin-Elmer DSC-8500 (PerkinElmer, USA) を用いて、温度範囲 -50°C~200°C、昇温速度 20°C/min、窒素雰囲気下において、示差走査熱量計 (DSC) により調べた。融点 ( $T_m$ ) および融解エンタルピー ( $\Delta H_m$ ) を測定は、サンプルを正確に計りとり (約 2 mg)、アルミニウムパンに入れ、昇温速度 20°C/min で -50°C から 200°C まで昇温する 1st scan によって行った。その後、サンプルを -50°C で急冷した後、昇温速度 20°C/min で -50°C から 200°C まで昇温した (second heating scan)。ガラス転移点 ( $T_g$ ) の値としては熱容量変化の midpoint 温度を採用した。

さらに、*E. coli* CAG18497/pTV118NpctC1(STQK)ldhD and pRKmXS-GMCL(Pa) から抽出したポリマーについて機械的特性を調べるために、クロロホルムに溶解したポリマーをスライドガラスの上に 10 mm × 3 mm になるように滴下し、ソルベントキャス

トフィルムを作製した。少なくとも2週間以上室温でエイジングさせることでクロロホルムを完全に揮発させ、結晶化させた (Appendix-2 参照)。

その後、Dynamic thermal mechanical analyzer DMA-8000 (PerkinElmer, USA) を用いて動的機械熱分析 (DMTA) により、貯蔵弾性率 ( $E'$ ) と損失係数 ( $\tan\delta$ ) を調べた。温度スキャンは、窒素雰囲気下において、 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の一定加熱速度で、 $1\text{ Hz}$  の振動周波数で温度範囲  $-80^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$  で行った。

### 4-3 結果および考察

新規乳酸ベースポリマーP(LA-co-3HB-co-3HA)および P(LA-co-3HA)を合成する経路 (Fig. 4-1) を大腸菌に導入し組換え株を作製した。組換え株が合成したポリマーのモノマー組成と蓄積率の GC 分析結果を Table 4-9 に示す。抽出したポリマーの分子量および熱的特性を Table 4-10 に示す。また、<sup>13</sup>C-NMR 解析の結果を Figs. 4-3 and 4-4、ポリマーの写真を Figs. 4-5 and 4-6 に示す。

まず、グルコースを唯一の炭素源として P(LA-co-3HB-co-3HA)を合成するために、プラスミド pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> および pRTcAA-GMCL(Pa)を大腸菌 DH5 $\alpha$  株 および LS5218 株 に 導 入 し た 。 第 三 章 に お い て pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> のみ導入した組換え株は P(LA-co-3HB)を合成したが、pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> および pRTcAA-GMCL(Pa)を導入した組換え株は、P(LA-co-3HB-co-3HA)を合成した (Table 4-9)。DH5 $\alpha$  株を宿主とした場合、17.0 wt% の蓄積率で、1.2 mol%の 3-ヒドロキシデカン酸 (3HD, C<sub>10</sub>) を含む P(9.9% LA-co-88.9% 3HB-co-1.2% 3HA)が合成された。その一方、LS5218 株が合成した P(14.4% LA-co-79.7% 3HB-co-5.9% 3HA)では、2.3 mol%の 3-ヒドロキシオクタン酸 (3HO, C<sub>8</sub>)、3.6 mol%の 3HD (C<sub>10</sub>)、さらには、炭素数 12 の 3-ヒドロキシドデカン酸 (3HDD, C<sub>12</sub>) および 3-ヒドロキシ-5-シス-ドデセン酸 (3H5DD, C<sub>12</sub>) ユニットの取り込みもわずかにみられた。大腸菌 LS5218 株 (*fadR*, *atoC2*(Con)) は脂肪酸分解の制御遺伝子の *fadR* が破壊されているため 3HA ユニットの取り込みが向上したと考えられる。以上により、グルコースを唯一の炭素源として、LA、3HB および 3HA からなる新規組成の乳酸ベースポリマーが合成された。

このように、新規モノマー組成からなるポリマーが合成されたため、ポリマーの構造解析を行った。LS5218/pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> and pRTcAA-GMCL(Pa)からポリマーを抽出し、NMR 解析を行った。<sup>1</sup>H-NMR 解析の結果、このポリエステルは、新規乳酸ベースポリマーP(19.7% LA-co-74.9% 3HB-co-5.4% 3HA)であることが明らかとなった (data not shown)。また、<sup>13</sup>C-NMR 解析により得られたシグナルによりモノマーの連鎖を確認した (Fig. 4-3)。以前に報告されている P(3HB-co-3HA)の結果<sup>75)</sup>と同様に、67.5 および 169 ppm 付近に 3HB\*-3HB および 3HB\*-3HA + 3HA\*-3HB の連鎖がみられた (Figs. 4-3B and 4-3C)。また、P(LA-co-3HB)でみられるピーク<sup>85)</sup>と同様に 68–69 ppm および 169–170 ppm に LA と 3HB の連鎖がみられた (Figs. 4-3B and 4-3C)。しかしながら、LA-3HA の連鎖を確認することはできなかった。

DSC 分析の結果、以前に報告されている P(29% LA-co-3HB)<sup>84)</sup>および P(3HB-co-6% 3HA)<sup>75)</sup>と同様に、融点 ( $T_m$ ) が 2 つみられた (124°C と 147°C) (Table 4-10)。また、ガラス転移点 ( $T_g$ ) は 6.7°C、融解エンタルピー ( $\Delta H_m$ ) は 19.6 J/g であり、これまでに合成された P(3HB-co-6% 3HA)<sup>68, 75)</sup>と比較して、高い  $T_g$  と低い  $\Delta H_m$  が得られた。一般的に、P(3HB-co-6% 3HA)コポリマーの  $T_m$  および  $\Delta H_m$  は、P(3HB)ホモポリマーと比較して、3HA 分率が増加するにつれて減少することが知られている。同様に、P(LA-

*co*-3HB-*co*-3HA)の  $T_m$  および  $\Delta H_m$  は、P(3HB)ホモポリマーよりも低かった (Table 4-10)。LA-3HA 連鎖の確認はできなかったこと、融点が2つみられたことから、この新規乳酸ベースポリマーはP(LA-*co*-3HB)とP(3HB-*co*-3HA)のブレンド体である可能性も示唆された。しかしながら、ランダムコポリマーにおいても2つのピークが観察されることがあり<sup>68,75)</sup>、さらに、GPC分析の結果、2つのピークは認められず、このポリマーの重量平均分子量 ( $M_w$ ) は31.7万、数平均分子量 ( $M_n$ ) は5.3万、多分散度 ( $M_w/M_n$ ) は5.9であることが明らかとなった (Table 4-10)。正瑞ら<sup>90)</sup>が、10–100 mg/Lのプロピオン酸ナトリウムを添加することにより合成した 8.7–27.4 mol%の LA と 0.2–7.2 mol%の 3HV を含む P(LA-*co*-3HB-*co*-3HV)の平均分子量は、25–42万であった ( $M_w/M_n$ : 2.8–4.8)。本研究で合成された P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)もこれに近い値を示した。また、共重合の型式には、それぞれ同種のモノマーから成るポリマー鎖が、1本の鎖の中に結合している重合体 (ブロック共重合体) や、ポリマー鎖中の任意の部位で、あるモノマー単位を見出す確率とその位置の隣接したモノマー単位と無関係である重合体 (ランダム共重合体) があり、一般的にランダム共重合体のポリマーの多分散度は1に近くなる。したがって、このポリマーはブロック性が高い共重合ポリマーであり、LA と 3HA 分率がいずれも 3HB 分率と比べて低いため <sup>13</sup>C-NMR によって LA-3HA の連鎖を確認することができなかったと考えられた。また、抽出したポリマーは透明ではなかった (Fig. 4-5)。LA と 3HA 分率を高めるため、培養条件を検討したが、3HB 分率が高く、LA および 3HA 分率を高めることはできなかった。そのため、次に、3HB ユニットの除いた LA と 3HA ユニットからなる P(LA-*co*-3HA)の生合成を試みた。

P(LA-*co*-3HA)を合成させるため P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)の合成経路から 3HB 供給経路 (PhaA および PhaB) を除いた代謝制御を行った (Fig. 4-1)。まず、プラスミド pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> から 3HB 供給系酵素遺伝子の *phaAB* 遺伝子を取り除いた pTV118NpctC1(STQK)ldhD を構築した。このプラスミドとともに pRTcAA-GMCL(Pa)を大腸菌 LS5218 株に導入し、これまでと同様に培養した。しかしながら、LS5218 組換え株は、ポリマーをほとんど合成せず、3HO および 3HD のピークのみしか確認できなかった (菌体量は 1.16 g/L、蓄積率は 0.3 wt%) (data not shown)。そこで、LS5218 株と同様に *fadR* 破壊株である CAG18497 (*fadR13::Tn10*) 株を宿主に選択した。

CAG18497 株はテトラサイクリン耐性菌であるため、テトラサイクリン耐性遺伝子を保有する pRTcAA-GMCL(Pa)を保持しない。そこで、*phaG<sub>Ps</sub>* および PA3924 遺伝子カナマイシン耐性遺伝子を有するプラスミド pBBR1MCS-2 に挿入し、pRKmXS-GMCL(Pa)を構築した。このプラスミドを pTV118NpctC1(STQK)ldhD とともに、大腸菌 CAG18497 株に導入した。その結果、組換え株は新規乳酸ベースポリマー-P(70.4% LA-*co*-29.6% 3HA)を合成し、4.2 mol%の 3HO (C<sub>8</sub>)、25.4 mol%の 3HD (C<sub>10</sub>)、さらには、炭素数 12 の 3HDD および 3H5DD ユニットの取り込みもわずかにみられた (Table 4-9)。CAG18497/pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> and pRKmXS-GMCL(Pa)では、80.0 mol %の 3HB ユニットを含む P(16.6% LA-*co*-80.0% 3HB-*co*-3.4% 3HA)が合成されたことから、3HB ユニット供給経路を除くことにより、LA ユニットと 3HA ユニットのみに

からなるポリマーの合成に成功したことが示された。このように、LS5218 および CAG18497 は両株とも *fadR* 破壊株であるが、P(LA-co-3HA) 生合成において違いがみられた。このような現象は、過去の研究においてもみられている。例えば、佐藤ら<sup>116)</sup>の研究のエノイル CoA ヒドラーターゼを利用した P(3HB) 合成システムにおいて、*phaC<sub>Re</sub>*、*phaA<sub>Re</sub>*、および *Aeromonas caviae* の (R) 体特異的エノイル CoA ヒドラーターゼ遺伝子 (*phaJ<sub>Ac</sub>*) を導入した CAG18497 株 (6.5 wt%) は、LS5218 株 (1.6 wt%) よりも多く P(3HB) を蓄積した。これは、二つの株の遺伝子型の違いによるものだと考えられている。LS5218 株は、CAG18497 株と異なり、*atoC2* (Con) 変異株である。*atoC* 遺伝子は短鎖長脂肪酸の利用 (ATO system) に必要な遺伝子の正の調節因子タンパク質をコードしているため、*atoC2* (Con) 変異株は、*ato* オペロンの転写が活動的である<sup>117,118)</sup>。*ato* オペロンによってコードされる酵素は  $\beta$  酸化経路の中間体を基質として利用するので、LS5218 株において、P(3HB) 合成へのフラックスが減少し、蓄積率が減少したと推測されている。さらに、LS5218 株と CAG18497 株では、遺伝子破壊方法が異なる。LS5218 株では化学変異剤により *fadR* 遺伝子が破壊されているが、CAG18497 株はテトラサイクリン耐性遺伝子を挿入することにより *fadR* 遺伝子が破壊されている<sup>107,113)</sup>。この違いが、脂肪酸代謝に関わる酵素遺伝子の発現レベルに影響している可能性がある。

また、CAG18497/pTV118NpctC1(STQK)ldhD and pRKmXS-GMCL(Pa) を 500 mL 容三角フラスコを用いて、培地量を 100 mL から 300 mL に増加して培養した。その結果、組換え株は 1.5 wt% の蓄積率で 1.3 mol% の 3HO (C<sub>8</sub>)、24.7 mol% の 3HD (C<sub>10</sub>)、さらには、炭素数 12 の 3HDD および 3H5DD ユニットを含む P(74.0% LA-co-26.0% 3HA) を合成した (菌体量は 0.41 g/L)。高 LA 分率のポリマーが合成できたため、これを抽出し、その特性を調べた。<sup>1</sup>H-NMR 解析の結果、このポリエステルは、新規乳酸ベースポリマー P(92.0% LA-co-8.0% 3HA) であることが明らかとなった (data not shown)。GC 分析の結果と違いがみられた原因として、組換え株は中鎖長 3HA のオリゴマーも生産されていて、ポリマー抽出時にメタノールで沈殿されなかったためと考えられた。また、<sup>13</sup>C-NMR 解析により得られたシグナルによりモノマーの連鎖を確認した (Fig. 4-4)。その結果、169–170 ppm に P(LA-co-3HB-co-3HA) では確認できなかった LA と 3HA ユニットの連鎖がみられた (LA-3HA\*-LA, LA-LA\*-3HA, LA-LA\*-LA and 3HA-LA\*-LA) (Fig. 4-4B)。さらに、69.0 ppm 付近に分裂したピークがみられ、これは LA\*-3HA に帰属される (Fig. 4-4C)。したがって、この P(LA-co-3HA) は LA と中鎖長 3HA ユニットの共重合体であり、PLA と P(3HA) のブレンドではないことが示された。

GPC 分析の結果、このポリエステルの重量平均分子量 ( $M_w$ ) は 2.7 万、数平均分子量 ( $M_n$ ) は 1.4 万、多分散度 ( $M_w/M_n$ ) は 2.0 であった。多分散度は 1 に近いため LA ユニットと 3HA ユニットが、ランダム性が高く共重合していると考えられた。山田ら<sup>84)</sup>は、ポリマー鎖中の LA 分率が増加するにつれて P(LA-co-3HB) の分子量 ( $M_w$ : 7–9 × 10<sup>4</sup>) が減少することを報告している。本研究においても、Table 4-10 に示したように、分子量は LA 分率が向上すると低下する傾向がみられた。この現象は、PhaC1(STQK) は基質としての D-LA-CoA への親和性が低いこと、また、LA 分率の高い乳酸ベース

ポリマーは流動性が低い（可動域が狭い）ために高分子量ポリマーの合成が妨げられていると報告されている<sup>89)</sup>。

DSC分析の結果、融点 ( $T_m$ ) は 157°C、ガラス転移点 ( $T_g$ ) は 36°C、融解エンタルピー ( $\Delta H_m$ ) は 6.4 J/g であった。融点は化学合成の PLA (150°C) とほぼ同じ値を示し、ガラス転移点は PLA よりも低かったが、P(3HB)ホモポリマーよりも高い値を示した。

Figure 4-6 に示したように、作製した P(92.0% LA-co-3HA) のソルベントキャストフィルムは、透明性を有していた。

P(92.0% LA-co-3HA) の動的機械熱分析 (DMTA) の結果、一般的に  $T_g$  として知られている  $\tan \delta$  ピーク温度は約 58°C であり、PLA (約 60°C)<sup>119)</sup> とほぼ同じ値だった。また、P(92.0% LA-co-3HA) の貯蔵弾性率 ( $E'$ ) は室温で約 2.3 GPa であり、PLA の一般的な貯蔵弾性率 (2.0–3.0 GPa)<sup>119, 120)</sup> と同じであった。さらに、その弾性率は、ガラス転移点より高い温度の 100°C においても約 2.0 GPa に維持された。したがって、本章で合成された P(92.0% LA-co-3HA) は PLA に類似した硬い素材であることが示された。

PLA と類似した素材である新規乳酸ベースポリマーの合成に成功した。本章で合成したポリマーは中鎖長 3HA が導入されたにも関わらず、柔軟性を有していなかった。柔軟性を付与するためには、3HA 供給経路の酵素遺伝子の発現を高めるなど、3HA モノマーフラックスを制御し、ポリマー鎖中の 3HA 分率を向上させる必要があると考えられた。

**Table 4-9 Accumulation of LA-based copolymer by recombinant *Escherichia coli* strains**

Strain	Plasmid	Dry cell weight (g/L)	Polymer content (wt%)	Polymer composition (mol %)						
				LA (C3)	3HB (C4)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')	
DH5 $\alpha$ *	pTV118NpctCl(STQK)ldhDABdP <sub>Re</sub>	0.70 $\pm$ 0.26	9.2 $\pm$ 5.2	13.7 $\pm$ 3.1	86.3 $\pm$ 3.1	0	0	0	0	0
LS5218*	pTV118NpctCl(STQK)ldhDABdP <sub>Re</sub>	1.48 $\pm$ 0.12	4.4 $\pm$ 0.7	15.7 $\pm$ 3.5	84.3 $\pm$ 3.5	0	0	0	0	0
DH5 $\alpha$	pTV118NpctCl(STQK)ldhDABdP <sub>Re</sub> and pRTcAA-GMCL(Pa)	0.59 $\pm$ 0.33	17.0 $\pm$ 4.2	9.9 $\pm$ 3.5	88.9 $\pm$ 3.4	0	1.2 $\pm$ 1.0	0	0	0
LS5218	pTV118NpctCl(STQK)ldhDABdP <sub>Re</sub> and pRTcAA-GMCL(Pa)	1.14 $\pm$ 0.06	2.9 $\pm$ 0.3	14.4 $\pm$ 1.8	79.7 $\pm$ 2.3	2.3 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 1.0	Trace	Trace	Trace
CAG18497	pTV118NpctCl(STQK)ldhDABdP <sub>Re</sub> and pRKmXS-GMCL(Pa)	1.06 $\pm$ 0.12	6.1 $\pm$ 3.4	16.6 $\pm$ 8.8	80.0 $\pm$ 8.2	0.5 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 1.9	Trace	Trace	Trace
CAG18497	pTV118NpctCl(STQK)ldhD and pRKmXS-GMCL(Pa)	0.95 $\pm$ 0.08	2.9 $\pm$ 0.7	70.4 $\pm$ 7.0	0	4.2 $\pm$ 1.0	25.4 $\pm$ 5.9	Trace	Trace	Trace

Cells were cultivated at 30°C in a 300-mL conical flask containing 100 mL of LB medium supplemented with 2% (w/v) glucose. LA, D-lactate; 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-5-*cis*-dodecenoate.

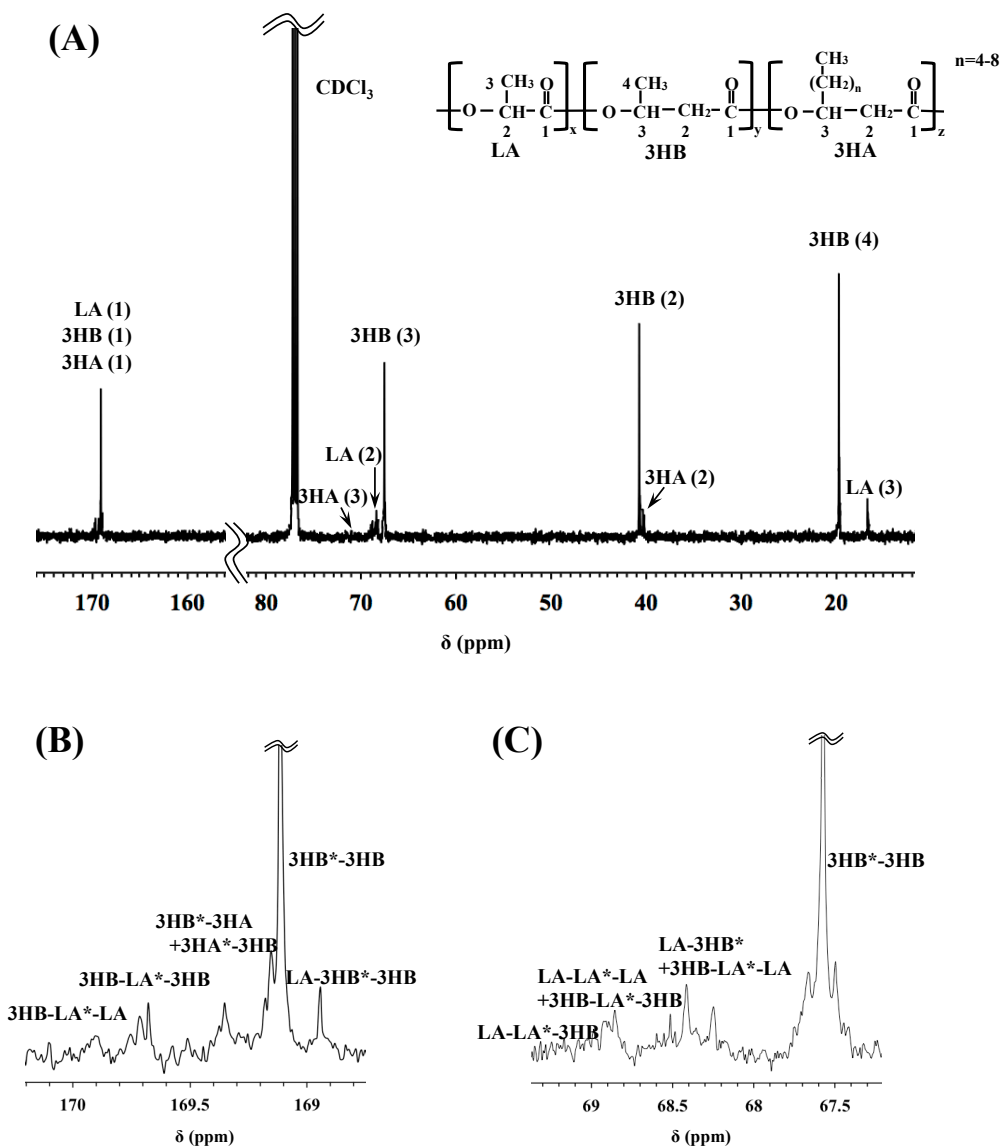
\* Data from Chapter 3.



**Table 4-10 Molecular weight and thermal properties of polyester**

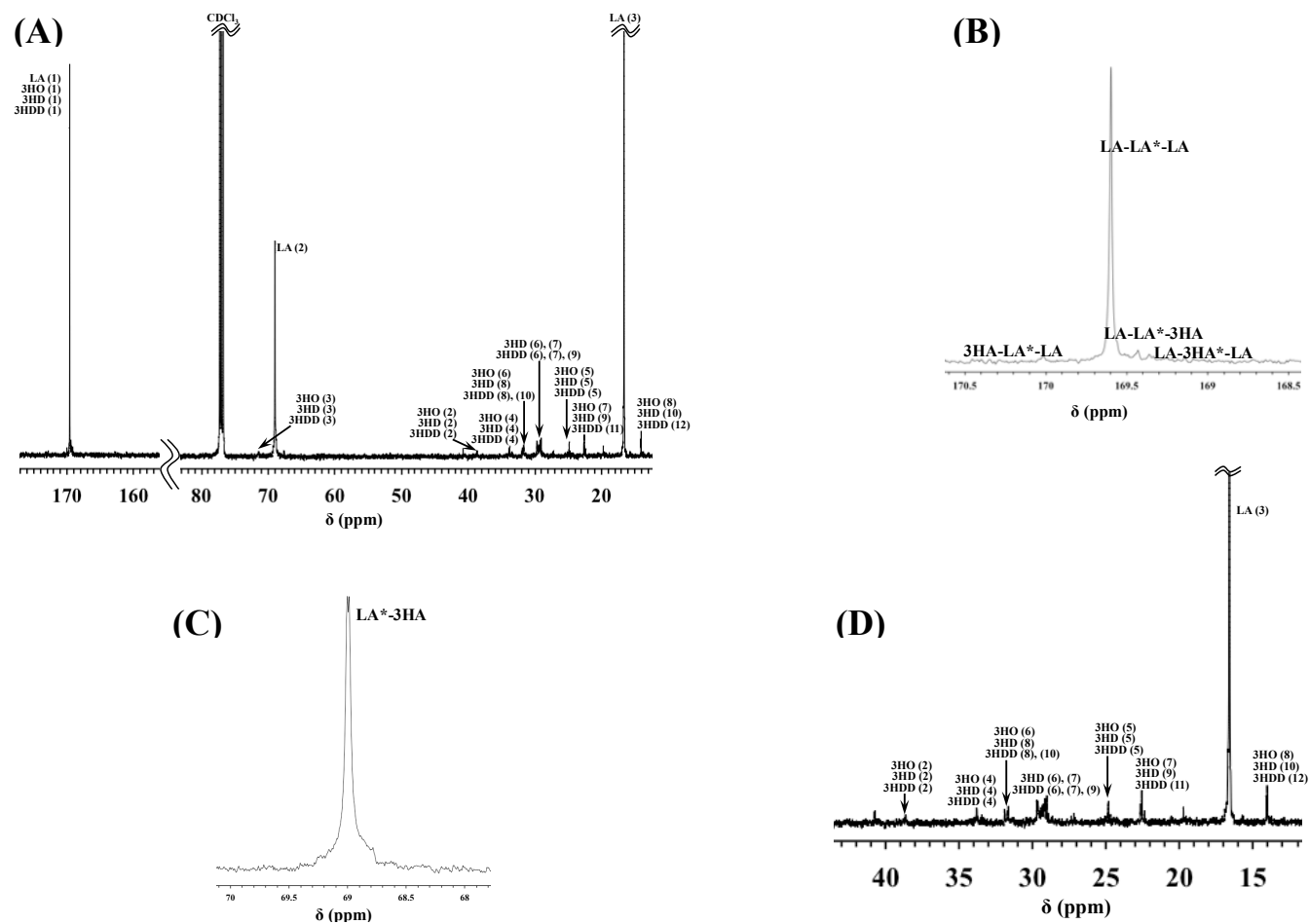
Sample	Molecular weight			Thermal properties		
	$M_w$ ( $\times 10^4$ )	$M_n$ ( $\times 10^4$ )	$M_w/M_n$	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_m$ (J/g)
PLA (4042D, NatureWorks <sup>®</sup> ) <sup>a)</sup>	7.7			150	52	1.3
P(29% LA-co-3HB) <sup>b)</sup>	9	4	2.2	141, 158	-8, 25	0.8, 3.8
P(19.7% LA-co-3HB-co-5.4% 3HA) <sup>c)</sup>	31.7	5.3	5.9	124, 147	6.7	19.6
P(92.0% LA-co-8.0% 3HA) <sup>c)</sup>	2.7	1.4	2.0	157	36	6.4
P(3HB-co-5.4% 3HA) <sup>d)</sup>	46.6	23.3	2.0	161	4.6	34.5
P(3HB-co-6% 3HA) <sup>e)</sup>	139	60.5	2.3	133, 146	-8	39
P(3HB) <sup>f)</sup>	117	65.0	1.8	178	4	91

PLA, L/D ratios from 24:1 to 30:1; LA, D-lactic acid; 3HB, 3-hydroxybutyrate (C<sub>4</sub>); 3HA, 3-hydroxyalkanoate (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>);  $M_w$ , weight-average molecular weight;  $M_n$ , number-average molecular weight;  $T_m$ , melting temperature;  $T_g$ , glass-transition temperature;  $\Delta H_m$ , enthalpy of fusion. <sup>a)</sup> Reference 119; <sup>b)</sup> Reference 84; <sup>c)</sup> This study; <sup>d)</sup> Reference 68; <sup>e)</sup> Reference 75; <sup>f)</sup> Reference 114.



**Fig. 4-3**  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (125 MHz) of the P(19.7% LA-co-3HB-co-5.4% 3HA) synthesized by the recombinant *E. coli* LS5218 strain harboring pTV118NpctC1(STQK) *ldhDABdP<sub>Re</sub>* and pRTcAA-GMCL(Pa).

(A) Full  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum containing all detected peaks. (B) Expanded 169–170 ppm part of full spectrum. (C) Expanded 67.5–69 ppm part of full spectrum. Carbon atoms in the copolymer are numbered and assigned to peaks in the spectrum. LA, D-lactate; 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HA, MCL-3-hydroxyalkanoate (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>).

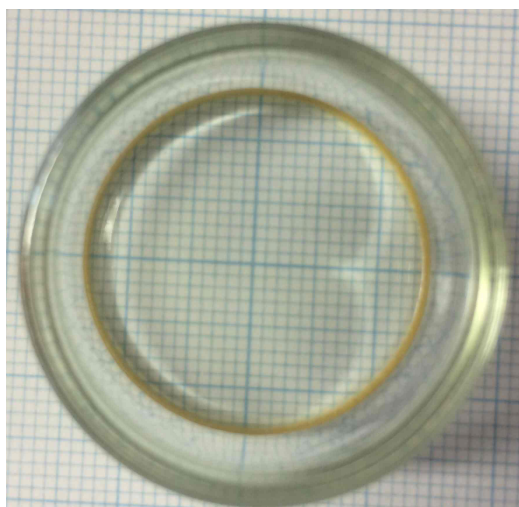


**Fig. 4-4**  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (125 MHz) of the P(92% LA-co-8% 3HA) synthesized by the recombinant *E. coli* CAG18497 strain harboring pTV118NpctC1(STQK)ldhD and pRKmXS-GMCL(Pa).

(A) Full  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum containing all detected peaks. (B) Expanded 169.5–170.5 ppm part of full spectrum. (C) Expanded 68–70 ppm part of full spectrum. (D) Expanded 15–40 ppm part of full spectrum. Carbon atoms in the copolymer are numbered and assigned to peaks in the spectrum. LA, D-lactate; 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3HA, MCL-3-hydroxyalkanoate (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>).



**Fig. 4-5 Polymer of P(19.7% LA-co-3HB-co-5.4% 3HA).**



**Fig. 4-6 Solvent-cast film of P(92.0% LA-co-8.0% 3HA).**

#### 4-4 小括

本章では、新規乳酸ベースポリマーP(LA-co-3HB-co-3HA)およびP(LA-co-3HA)の合成を試みた。

脂肪酸合成経路から(R)-3HA-CoAを得るため、*Pseudomonas* sp. 61-3由来の *phaG* 遺伝子と *Pseudomonas aeruginosa* PAO の(R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子 (PA3924) を挿入したプラスミド pRTcAA-GMCL(Pa)および pRKmXS-GMCL(Pa)を構築した。pRTcAA-GMCL(Pa)を pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> とともに大腸菌 DH5 $\alpha$  株および LS5218 株に導入すると、それらの組換え株はグルコースを唯一の炭素源として P(LA-co-3HB-co-3HA)を合成した。とくに LS5218 株を宿主とし、pTV118NpctC1(STQK)ldhDABdP<sub>Re</sub> および pRTcAA-GMCL(Pa)を導入した株は、P(14.4% LA-co-79.7% 3HB-co-5.9% 3HA)を合成し、中鎖長 3HA ユニットの取り込みが高まった。<sup>1</sup>H-NMR 解析の結果、このポリマーは、P(19.7% LA-co-74.9% 3HB-co-5.4% 3HA)であることがわかった。<sup>13</sup>C-NMR 解析において、LA-3HB と 3HB-3HA の連鎖が確認されたが、LA-3HA の連鎖を示すシグナルは検出されなかった。したがって、次に LA と中鎖長 3HA ユニットからなる P(LA-co-3HA)の合成を試みた。

3HB 供給系酵素遺伝子の *phaAB* 遺伝子を取り除いた pTV118NpctC1(STQK)ldhD を構築し、pRKmXS-GMCL(Pa)とともに大腸菌 CAG18497 株に導入すると、組換え株はグルコースを唯一の炭素源として P(LA-co-3HA)を合成した。500 mL 容三角フラスコを用いて 300 mL LB 培地において培養した場合、P(74.0% LA-co-3HA)が合成された。<sup>1</sup>H-NMR 解析の結果、このポリマーは、P(92.0% LA-co-3HA)であることがわかった。このポリマーの <sup>13</sup>C-NMR 解析において、LA-3HA の連鎖が確認でき、P(92% LA-co-3HA)は共重合体であることが示された。また、P(92% LA-co-3HA)のソルベントキャストフィルムは透明であり、PLA と類似した素材であることが明らかとなった。

以上より、糖を唯一の炭素源とした新規乳酸ベースポリマーP(LA-co-3HB-co-3HA)およびP(LA-co-3HA)の合成経路を確立することに成功した。今後、この合成経路のモノマーフラックスを制御することによりさまざまな特性を有する乳酸ベースポリマーの合成が期待できる。

## 第五章

### 総括

論文課題「乳酸ベースコポリマーの微生物合成に関する研究」として、乳酸脱水素酵素遺伝子のクローニングと同定、さらには、大腸菌を宿主とした乳酸ベースコポリマーの合成を行った。

第一章「序論」では、本研究のキーワードである乳酸や生分解性プラスチックの背景と目的について述べた。

乳酸菌が生産する乳酸は、食品、化学工業、医薬品などさまざまな分野で幅広く利用されており、特に、近年は、生分解性プラスチックのポリ乳酸 (PLA) の原料として、需要が増大している。工業利用において、乳酸は主に発酵法により生産されるが、最終生産物である乳酸の阻害により、菌体増殖と乳酸生産速度が発酵中に急激に低下することが問題点として挙げられる。そのため、乳酸の阻害を受けにくい耐酸性菌が乳酸発酵には望ましいとされている。また、PLA には、D-乳酸 (D-LA) を単位とするポリ-D-乳酸 (PDLA) と L-乳酸 (L-LA) を単位とするポリ-L-乳酸 (PLLA) があり、PDLA と PLLA が 1:1 で混合したステレオコンプレックス PLA (SC-PLA) は、熱特性が向上することが知られている<sup>45)</sup>。したがって、D-あるいはL-乳酸を選択的に製造することが求められているが、D-乳酸生産に利用できる菌は少ない。そこで本研究では、DL-乳酸を生産する耐酸性乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* HT<sup>18)</sup>に着目し、乳酸を生成する上で最も重要な乳酸脱水素酵素 (LDH) 遺伝子のクローニングと同定を行った。

環境中の微生物によって、水と二酸化炭素にまで分解される生分解性プラスチックは、環境負荷低減が期待されている。そのひとつであるポリ乳酸 (PLA) は、通常ラクチドを経由した化学的重合法により合成される。PLA は透明性や加工性に優れるが、触媒として有害な重金属が使われていること、発酵させた乳酸を精製して合成するなど合成ステップが多いことが課題点としてあげられる。一方、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、微生物がエネルギー貯蔵物質として菌体内に蓄積する生分解性プラスチックである。PHA は、菌体内において PHA 重合酵素により重合するため環境負荷がより低いといえるが、一般的に不透明である。

最近、微生物が PHA を合成するシステムを利用して微生物菌体内での乳酸 (LA) ユニットを含む生分解性プラスチック (乳酸ベースポリマー) の生合成が検討されている<sup>83)</sup>。この製造方法では、D-lactyl-CoA (D-LA-CoA) を基質として認識できるように改変した PHA 重合酵素を用いて、微生物により生産させた乳酸を菌体内で重合するため、有害な重金属を利用せずに、生分解性プラスチックが一段階で合成できる。この改変 PHA 重合酵素は D-LA モノマーを単体では高分子量のホモポリマーを重合することができないが、(R)-3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) モノマーとの共重合体であれば、乳酸ベースポリマーを合成させることができる<sup>80,81,89)</sup>。それゆえ、PLA ホモポリマーを微生物合成することは難しいが、LA 分率を高めることにより、PLA と似た透明性を有する乳酸ベースコポリマーを合成することができる<sup>84)</sup>。したがって、この研究の発展により、PLA と性質の似た生分解性プラスチックの微生物合成の汎用化が可能であると考えられる。そこで、LA 分率を高めた乳酸ベースコポリマーの合成を目指し、D-乳酸脱水素酵素遺伝子導入株による乳酸ベースコポリマーの合成を行うこと

を目的とした。また、乳酸ベースコポリマーの実用化のためには、透明性のみでなく、さまざまな特性を有する素材の開発が必要である。しかしながら、さまざまな組成からなる乳酸ベースコポリマーについての研究は少ない。したがって、新規組成の乳酸ベースコポリマーを合成することを目指した。

第二章「耐酸性乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* HT の乳酸脱水素酵素遺伝子のクローニングと同定」では、HT 株の D-および L-乳酸脱水素酵素 (D-LDH、L-LDH1 および L-LDH2) 遺伝子の各構造遺伝子とその周辺を含む領域の塩基配列を決定した (DDBJ accession nos. LC378394、LC378395 および LC378396)。HT 株の D-LDH、L-LDH1 および L-LDH2 遺伝子 (*ldhD*、*ldhL1* および *ldhL2*) は、それぞれ 1,005、972 および 930 塩基対からなり、334、323 および 309 アミノ酸残基からなる推定分子量 37 kDa、35 kDa および 33 kDa のタンパク質をそれぞれコードしていることを明らかにした。これらの遺伝子の推定翻訳産物の相同性検索を行った結果、*Lb. acetotolerans* DSM 20749 および *Lb. acetotolerans* RIB 9124 の LDHs のアミノ酸配列と 99-100%の相同性が見られた。さらに、HT 株の各 LDH 遺伝子の大腸菌による異種発現の結果、*ldhD* および *ldhL1* 遺伝子導入株は、D-乳酸および L-乳酸をそれぞれ生産した。したがって、*ldhD* 遺伝子および *ldhL1* 遺伝子の翻訳産物は、それぞれ D-LDH および L-LDH であることが示された。しかしながら、*ldhL2* 遺伝子導入株は乳酸を生産しなかったため、*ldhL2* 遺伝子の翻訳産物に LDH としての機能を見出すことはできなかった。*ldhL2* 遺伝子は LDH としての機能を有さない可能性があるため、今後、*in vitro* 実験によりその機能を確認する必要がある。

第三章「*Lactobacillus acetotolerans* HT の D-乳酸脱水素酵素遺伝子を導入した大腸菌組換え株による乳酸ベースコポリマーの合成」では、HT 株の *ldhD* 遺伝子を利用して LA ユニットと 3HB ユニットからなる乳酸ベースコポリマー-P(LA-co-3HB)を合成させた。大腸菌は、嫌氣的に培養すると D-乳酸 (D-LA) 生産量は増加するが、菌体の増殖は減少する<sup>84, 110, 111</sup>)。また、D-LA に CoA を付与し D-LA-CoA とするために必要なアセチル CoA は好氣的条件下においてその生産量が高まる。そこで、好氣的条件でも D-乳酸を生産させるため、外在性の D-LDH 遺伝子として、第二章でクローニングした HT 株の *ldhD* 遺伝子が大腸菌へ導入した。この遺伝子とともに、D-LA に CoA を付与するプロピオニル-CoA トランスフェラーゼ (PCT) 遺伝子、(R)-3HB-CoA を供給する  $\beta$ -ケトチオラーゼ (PhaA) 遺伝子および NADPH 依存性アセトアセチル CoA リダクターゼ (PhaB) 遺伝子、改変 PHA 重合酵素 PhaC1(STQK)遺伝子が大腸菌に導入し、ポリマーの合成を行った。その結果、微好氣的条件下において、*ldhD* 遺伝子導入株 (乳酸濃度は 0.13 g/L、LA 分率は 19.8 mol%) は、それを導入しなかった株 (乳酸濃度は < 0.01 g/L、LA 分率は 9.8 mol%) と比べて D-乳酸生産量とポリマー鎖中の LA 分率が高まった。また、さまざまな大腸菌を宿主とした場合においても、*ldhD* 遺伝子導入によるポリマー鎖への LA 分率の向上が認められた。

第四章「大腸菌を宿主とした新規乳酸ベースコポリマーの合成」では、グルコースを唯一の炭素源として新規組成の乳酸ベースコポリマーを合成した。代表的な PHA で



あるポリ-(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸 (P(3HB)) ホモポリマーは硬くて脆い性質を有するが、*Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株が合成した 3HB と中鎖長(*R*)-3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) とのランダム共重合体 P(94% 3HB-*co*-3HA)は、柔軟性を示す<sup>75)</sup>。したがって、柔軟性のある透明な材質をめざし、中鎖長 3HA ユニットを含む乳酸ベースコポリマーの合成を試みた。これまでに大腸菌を宿主とし、糖から脂肪酸合成経路を介して P(3HB-*co*-3HA)が合成されている<sup>68,79)</sup>。そこでまず、これまでに合成されてきた P(LA-*co*-3HB)合成経路に、糖から脂肪酸合成経路を介して(*R*)-3HA-CoA を供給する経路を構築し、P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)の合成を試みた。D-LA-CoA を供給する *pct* および *ldhD* 遺伝子、(*R*)-3HB-CoA を供給する *phaA* および *phaB* 遺伝子、改変 PHA 重合酵素 *phaC1*(*STQK*)遺伝子とともに、中鎖長(*R*)-3HA-CoA を脂肪酸合成経路から供給する(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼ (PhaG) および(*R*)-3HA-CoA リガーゼの遺伝子が大腸菌に導入し、グルコースを唯一の炭素源としてポリマーの合成を行った。その結果、組換え株は P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)を合成した。特に、*fadR* 破壊株である LS5218 (*fadR601, atoC2*(Con)) を宿主とした場合、P(14.4% LA-*co*-79.7% 3HB-*co*-5.9% 3HA)を合成し、2.3 mol%の 3-ヒドロキシオクタン酸 (3HO, C<sub>8</sub>)、3.6 mol%の 3-ヒドロキシデカン酸 (3HD, C<sub>10</sub>)、さらには、炭素数 12 の 3-ヒドロキシドデカン酸 (3HDD, C<sub>12</sub>) および 3-ヒドロキシ-5-シス-ドデセン酸 (3H5DD, C<sub>12'</sub>) ユニットの取り込みもわずかにみられた。このように広範囲の炭素数 (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>および C<sub>12'</sub>) のモノマーからなる新規乳酸ベースポリマーの合成はこれまでに報告されていない。このポリマーを抽出して <sup>1</sup>H-NMR 解析を行った結果、P(19.7% LA-*co*-74.9% 3HB-*co*-5.4% 3HA)であることがわかった。また、<sup>13</sup>C-NMR 解析の結果、LA-3HB および 3HB-3HA の連鎖がみられた。しかしながら、LA-3HA の連鎖はみられなかった。これは、LA と 3HB 分率に比べて 3HA 分率が低いためであると考えられたが、P(LA-*co*-3HB)と P(3HB-*co*-3HA)のブレンド体が合成されている可能性を否定することはできなかった。そこで、次に P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)合成経路から 3HB 供給経路 (PhaA および PhaB)を除いた P(LA-*co*-3HA)の合成を試みた。その結果、LS5218 と同様に *fadR* 破壊株である CAG18497 (*fadR13::Tn10*) を宿主とした場合、新規乳酸ベースポリマーP(74.0% LA-*co*-3HA)が合成された。このポリマーを抽出して <sup>1</sup>H-NMR 解析を行った結果、LA 分率が高い新規乳酸ベースポリマーP(92.0% LA-*co*-3HA)であることがわかった。また、<sup>13</sup>C-NMR 解析の結果、LA-3HA の連鎖が確認でき、P(92% LA-*co*-3HA)は共重合体であることが示された。さらに、P(92% LA-*co*-3HA)のソルベントキャストフィルムは透明であり、PLA と類似した素材であることが明らかとなった。

以上より、本博士論文研究において、*Lb. acetotolerans* HT の LDHs 遺伝子のクローニングと同定を行い、*Lb. acetotolerans* HT の *ldhD* 遺伝子を利用して LA 分率を高めた乳酸ベースコポリマーの合成に成功した。さらに、本研究では、新規乳酸ベースコポリマーP(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)および P(LA-*co*-3HA)を初めて合成することに成功したのに加え、グルコースを唯一の炭素源として、PLA と類似した素材の乳酸ベースコポリマーの合成にも成功した。この研究成果は、モノマー組成を変化させることによって

さまざまな特性を持つ乳酸ベースコポリマーの合成を可能とし、乳酸ベースポリマーの実用化へと繋がると期待する。また、*Lb. acetotolerans* HT は、耐酸性の乳酸菌であるため、低い pH においても増殖し、乳酸を生産する。したがって、本研究により明らかとなった *ldhL* 遺伝子を破壊することで、*Lb. acetotolerans* HT を D-乳酸生産菌として、あるいは、乳酸ベースコポリマーの優れた宿主としての研究の発展が期待される。

## 引用文献

1. Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P., Moon, S.H., and Frank, J.R. (1995) Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.*, **16**, 221-231. doi:10.1016/0168-6445(94)00055-4
2. 一般社団法人日本食品添加物協会 (<https://www.jafaa.or.jp/>)
3. Garlotta D (2001) A literature review of poly(lactic Acid). *J. Polym. Environ.*, **9**, 63-83. doi:10.1023/A:1020200822435
4. Adachi, E., Torigoe, M., Sugiyama, M., Nikawa, J.I., and Shimizu, K. (1998) Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 284-289. doi:10.1016/S0922-338X(98)80131-1
5. 小崎道雄、佐藤英一 (2004) 乳酸発酵の新しい系譜, 中央法規出版
6. Jambunathan, P. and Zhang, K. (2016) Engineered biosynthesis of biodegradable polymers. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 1037-1058. doi:10.1007/s10295-016-1785-z
7. Liu, S. Q. (2003) Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, **83**, 115-131. doi:10.1016/S0168-1605(02)00366-5
8. 上野川修一 (2007) 乳酸菌の保健機能と応用, シーエムシー出版
9. Taguchi, S., Ooi, T., Mizuno, K., and Matsusaki, H. (2015) Advances and needs for endotoxin-free production strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 9349-9360. doi:10.1007/s00253-015-6947-9
10. Mokoena, M.P. (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, **22**, 1255 (13 pages). doi:10.3390/molecules22081255
11. Abdel-Rahman, M.A. and Sonomoto, K. (2016) Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. *J. Biotechnol.*, **236**, 176-192. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.08.008
12. Singhvi, M., Zendo, T., and Sonomoto, K. (2018) Free lactic acid production under acidic

- conditions by lactic acid bacteria strains: challenges and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 5911-5924. doi:10.1007/s00253-018-9092-4
13. Zhou, S., Causey, T.B., Hasona, A., Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. (2003) Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 399-407. doi:10.1128/AEM.69.1.399-407.2003
  14. Singhvi, M., Jadhav, A., and Gokhale, D. (2013) Supplementation of medium with diammonium hydrogen phosphate enhanced the D-lactate dehydrogenase levels leading to increased D-lactic acid productivity. *Bioresour. Technol.*, **146**, 736-739. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.057
  15. Entani, E., Masai, H., and Suzuki, K. (1986) *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 544-549. doi:10.1099/00207713-36-4-544
  16. Nakayama, J., Hoshiko, H., Fukuda, M., Tanaka, H., Sakamoto, N., Tanaka, S., Ohue, K., Sakai, K., and Sonomoto, K. (2007) Molecular monitoring of bacterial community structure in long-aged Nukadoko: pickling bed of fermented rice bran dominated by slow-growing lactobacilli. *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 481-489. doi:10.1263/jbb.104.481
  17. Sakamoto, N., Tanaka, S., Sonomoto, K., and Nakayama, J. (2011) 16S rRNA pyrosequencing-based investigation of the bacterial community in *Nukadoko*, a pickling bed of fermented rice bran. *Int. J. Food Microbiol.*, **144**, 352-359. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.017
  18. Tanaka, K., Tajiri, S., Sawada, R., Kawamoto, Y., Matsubara, T., Hoshino, M., and Matsusaki, H. (2015) Acid-tolerant lactic acid bacterium isolated from rice vinegar. *IMPACT: Int. J. Res. Appl. Natural Soc. Sci.*, **3**, 29-36.
  19. Tanaka, K., Sakai, K., Goto, S., and Matsusaki, H. (2017) Effect of adding fatty acid in culture medium on cell growth of acid tolerant lactic acid bacterium. *Int. J. Sci. Eng. Invest.*, **6**, 78-81.
  20. Toh, H., Morita, H., Tsuji, H., Iwashita, K., Goto, N., Nakayama, J., Sekine, M., Kato, Y., Suzuki, K., and Fujita, N. (2015) Complete genome sequence of *Lactobacillus acetotolerans*

- RIB 9124 (NBRC 13120) isolated from putrefied (hiochi) Japanese sake. *J. Biotechnol.*, **214**, 214-215. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.09.006
21. 一般社団法人プラスチック循環利用研究会 (<http://www.pwmi.or.jp/index.php>)
  22. European Commission, [https://ec.europa.eu/commission/index\\_en](https://ec.europa.eu/commission/index_en)
  23. Tokiwa, Y., Calabia, B., Ugwu, C., and Aiba, S. (2009) Biodegradability of plastics. *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 3722-3742. doi:10.3390/ijms10093722
  24. 常盤豊 (2004) バイオプロセスと生分解性プラスチック, 環境バイオテクノロジー学会誌, **4**, 5-17.
  25. 日本バイオプラスチック研究会 (2009) トコトンやさしいバイオプラスチックの本, 日刊工業新聞社
  26. 土肥義治 (1996) 生分解性プラスチック, 化学と教育, **44**, 441-443.
  27. Luckachan, G.E. and Pillai, C.K.S. (2011) Biodegradable polymers- a review on recent trends and emerging perspectives. *J. Polym. Environ.*, **19**, 637-676. doi:10.1007/s10924-011-0317-1
  28. 大塚桂一 (2003) 「グリーンプラ」で環境ビジネスが変わる, 中央経済社
  29. 日本バイオプラスチック協会 (<http://www.jbpaweb.net/index.htm>)
  30. Carothers, W.H., Dorough, G.L., and Van Natta, F.J. (1932) Studies of polymerization and ring formation. X. The reversible polymerization of six-membered cyclic esters. *J. Am. Chem. Soc.*, **54**, 761-772. doi:10.1021/ja01341a046
  31. Kawai, F., Nakadai, K., Nishioka, E., Nakajima, H., Ohara, H., Masaki, K., and Iefuji, H. (2011) Different enantioselectivity of two types of poly(lactic acid) depolymerases toward poly(L-lactic acid) and poly(D-lactic acid). *Polym. Degrad. Stab.*, **96**, 1342-1348. doi:10.1016/j.polyimdegradstab.2011.03.022
  32. Prieto, A. (2016) To be, or not to be biodegradable... that is the question for the bio-based plastics. *Microb. Biotech.*, **9**, 652-657. doi:10.1111/1751-7915.12393
  33. 筏義人 (1999) 生分解性高分子の基礎と応用, アイピーシー
  34. Fukushima, K., Furuhashi, Y., Sogo, K., Miura, S., and Kimura, Y. (2005) Stereoblock poly(lactic acid): Synthesis via solid-state polycondensation of a stereocomplexed mixture of poly(L-lactic acid) and poly(D-lactic acid). *Macromol. Biosci.*, **5**, 21-29.

doi:10.1002/mabi.200400121

35. Lowe, C.E. (1954) Preparation of high molecular weight polyhydroxyacetic ester. US Pat. No. 2,668,162.
36. 辻秀人、筏義人 (1997) ポリ乳酸-医療・製剤・環境のために-, 高分子刊行会
37. Corneillie, S. and Smet, M. (2015) PLA architectures: the role of branching. *Polym. Chem.*, **6**, 850-867. doi:10.1039/C4PY01572J
38. Enomoto, K., Ajioka, M., and Yamaguchi, A. (1994) Polyhydroxycarboxylic acid and preparation process thereof. US Pat. No. 5,310,865
39. Ichikawa, F., Kobayashi, M. Ohta, M. Yoshida, Y., Obuchi, S., and Itoh, H. (1995) Process for preparing polyhydroxycarboxylic acid. US Pat. No. 5,440,008.
40. Kashima, T., Kameoka, T., Higuchi, C., Ajioka, M., and Yamaguchi, A. (1995) Aliphatic polyester and preparation process thereof. US Pat. No. 5,428,126.
41. Ohta, M. Obuchi, S., and Yoshida, Y. (1995) Preparation process of polyhydroxycarboxylic acid. US Pat. No. 5,444,143.
42. Ikada, Y., Jamshidi, K., Tsuji, H., and Hyon, S.H. (1987) Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactides). *Macromolecules*, **20**, 904-906. doi:10.1021/ma00170a034
43. Tsuji, H. and Fukui, I. (2003) Enhanced thermal stability of poly(lactide)s in the melt by enantiomeric polymer blending. *Polymer*, **44**, 2891-2896. doi:10.1016/S0032-3861(03)00175-7
44. Fukushima, K., Chang, Y.H., and Kimura, Y. (2007) Enhanced stereocomplex formation of poly(L-lactic acid) and poly(D-lactic acid) in the presence of stereoblock poly(lactic acid). *Macromol. Biosci.*, **7**, 829-835. doi:10.1002/mabi.200700028
45. Tsuji, H. (2016) Poly(lactic acid) stereocomplexes: A decade of progress. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **107**, 97-135. doi:10.1016/j.addr.2016.04.017.
46. Sun, J., Matsumoto, K., Tabata, Y., Kadoya, R., Ooi, T., Abe, H., and Taguchi, S. (2015) Molecular weight-dependent degradation of D-lactate-containing polyesters by polyhydroxyalkanoate depolymerases from *Variovorax* sp. C34 and *Alcaligenes faecalis* T1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 9555-9563. doi:10.1007/s00253-015-6756-1
47. Anderson, A.J. and Dawes, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and

- industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, **54**, 450-472.
48. Müller, H.M. and Seebach, D. (1993) Poly(hydroxyalkanoates): a fifth class of physiologically important organic biopolymers? *Angew. Chem. Int. Ed.*, **32**, 477-502. doi:10.1002/anie.199304771.
  49. Madison, L.L. and Huisman, G.W. (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 21-53.
  50. Sudesh, K., Abe, H., and Doi, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, **25**, 1503-1555. doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
  51. Lemoigne, M. (1926) Produits de dehydration et de polymerization de l'acide  $\beta$ -oxybutyric. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **8**, 770-782
  52. Możejko-Ciesielska, J. and Kiewisz, R. (2016) Bacterial polyhydroxyalkanoates: still fabulous? *Microbiol. Res.*, **192**, 271-282. doi:10.1016/j.micres.2016.07.010
  53. Steinbüchel, A. and Valentin, H.E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**, 219-228. doi:10.1016/0378-1097(95)00125-0
  54. Steinbüchel, A. (2001) Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromol. Biosci.*, **1**, 1-24. doi:10.1002/1616-5195(200101)1:1<1::AID-MABI1>3.0.CO;2-B
  55. Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., and Tabasum, S. (2016) Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.*, **89**, 161-174. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
  56. Nomura, C.T., Tanaka, T., Eguen, T.E., Appah, A.S., Matsumoto, K., Taguchi, S., Ortiz, C.L., and Doi, Y. (2008) FabG mediates polyhydroxyalkanoate production from both related and nonrelated carbon sources in recombinant *Escherichia coli* LS5218. *Biotechnol. Prog.*, **24**, 342-351. doi:10.1021/bp070303y
  57. Fukui, T. and Doi, Y. (1997) Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.*, **179**, 4821-4830.

doi:10.1128/jb.179.15.4821-4830.1997

58. Fukui, T., Yokomizo, S., Kobayashi, G., and Doi, Y. (1999) Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (*R*)-enoyl-CoA hydratase genes of *Aeromonas caviae* establishes copolyester biosynthesis pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **170**, 69-75. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13356.x
59. Ren, Q., Kessler, B., Van Der Leij, F., and Witholt, B. (1998) Mutants of *Pseudomonas putida* affected in poly-3-hydroxyalkanoate synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 743-750. doi:10.1007/s002530051241
60. Tsuge, T., Fukui, T., Matsusaki, H., Taguchi, S., Kobayashi, G., Ishizaki, A., and Doi, Y. (2000) Molecular cloning of two (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 193-198. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09013.x
61. Tsuge, T., Taguchi, K., Taguchi, S., and Doi, Y. (2003) Molecular characterization and properties of (*R*)-specific enoyl-CoA hydratases genes from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Int. J. Biol. Macromol.*, **31**, 195-205. doi:10.1016/S0141-8130(02)00082-X
62. Kawashima, Y., Cheng, W., Mifune, J., Orita, I., Nakamura, S., and Fukui, T. (2012) Characterization and functional analysis of *R*-specific enoyl coenzyme A hydratases in polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 493-502. doi:10.1128/AEM.06937-11
63. Rehm, B.H.A., Krüger, N., and Steinbüchel, A. (1998) A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The *phaG* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme A transferase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24044-24051. doi:10.1074/jbc.273.37.24044
64. Hoffman, N., Steinbüchel, A., and Rehm, B.H.A. (2000) The *Pseudomonas aeruginosa phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 253-259. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09023.x
65. Matsumoto, K., Matsusaki, H., Taguchi, S., Seki, M., and Doi, Y. (2001) Cloning and



- characterization of the *Pseudomonas* sp. 61-3 *phaG* gene involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Biomacromolecules*, **2**, 142-147. doi:10.1021/bm005604+
66. Rehm, B.H.A., Mitsky, T.A., and Steinbüchel, A. (2001) Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3102-3109. doi:10.1128/AEM.67.7.3102-3109.2001
67. Wang, Q., Tappel, R.C., Zhu, C., and Nomura, C.T. (2012) Development of a new strategy for production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate by recombinant *Escherichia coli* via inexpensive non-fatty acid feedstocks. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 519-527. doi:10.1128/AEM.07020-11
68. Hokamura, A., Wakida, I., Miyahara, Y., Tsuge, T., Shiratsuchi, H., Tanaka, K., and Matsusaki, H. (2015) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant *Escherichia coli* from glucose. *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 305-310. doi:10.1016/j.jbiosc.2015.01.022
69. 松崎弘美, 田口精一, 土肥義治 (1999) 環境調和型バイオポリエステル研究の新展開 : 代謝制御工学から分子生理まで, 日本油化学会, **48**, 1353-1364
70. Huisman, G.W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P., and Witholt, B. (1991) Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.*, **266**, 2191-2198.
71. Timm, A. and Steinbüchel, A. (1992) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem.*, **209**, 15-30. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17256.x
72. Matsusaki, H., Manji, S., Taguchi, K., Kato, M., Fukui, T., and Doi, Y. (1998) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J. Bacteriol.*, **180**, 6459-6467.
73. Holmes, P.A. (1985) Applications of PHB-a microbially produced biodegradable

- thermoplastic. *Phys. Technol.*, **16**, 32-36. doi:10.1088/0305-4624/16/1/305
74. Doi, Y. (1995) Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. *Macromol. Symp.*, **98**, 585-599. doi:10.1002/masy.19950980150
75. Matsusaki, H., Abe, H., and Doi, Y. (2000) Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, **1**, 17-22. doi:10.1021/bm9900040
76. Tappel, R.C. and Nomura, C.T. (2012) Recent advances in polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*. In *Degradable Polymers and Materials: Principles and Practice* (2nd Edition), Chapter 9, pp 141-156. ACS Symposium Series; American Chemical Society, Washington, DC. doi:10.1021/bk-2012-1114.ch009
77. Schubert, P., Steinbüchel, A., and Schlegel, H.G. (1988) Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 5837-5847. doi:10.1128/jb.170.12.5837-5847.1988
78. Phithakrotchanakoon, C., Champreda, V., Aiba, S., Pootanakit, K., and Tanapongpipat, S. (2013) Engineered *Escherichia coli* for short-chain-length medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer biosynthesis from glycerol and dodecanoate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1262-1268. doi:10.1271/bbb.130073
79. Tappel, R.C., Pan, W., Bergey, N.S., Wang, Q., Patterson, I.L., Ozumba, O.A., Matsumoto, K., Taguchi, S., and Nomura, C.T. (2014) Engineering *Escherichia coli* for improved production of short-chain-length-co-medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] (SCL-co-MCL PHA) copolymers from renewable nonfatty acid feedstocks. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2**, 1879-1887. doi:10.1021/sc500217p
80. Matsumoto, K. and Taguchi, S. (2010) Enzymatic and whole-cell synthesis of lactate-containing polyesters: toward the complete biological production of polylactate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 921-932. doi:10.1007/s00253-009-2374-0
81. Matsumoto, K. and Taguchi, S. (2013) Enzyme and metabolic engineering for the production of novel biopolymers: crossover of biological and chemical processes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **24**, 1054-1060. doi:10.1016/j.copbio.2013.02.021
82. Takase, K., Taguchi, S., and Doi, Y. (2003) Enhanced synthesis of poly(3-hydroxybutyrate)

- in recombinant *Escherichia coli* by means of error-prone PCR mutagenesis, saturation mutagenesis, and in vitro recombination of the type II polyhydroxyalkanoate synthase gene. *J. Biochem.*, **133**, 139-145. doi:10.1093/jb/mvg015
83. Taguchi, S., Yamada, M., Matsumoto, K., Tajima, K., Satoh, Y., Munekata, M., Ohno, K., Kohda, K., Shimamura, T., Kambe, H., and Obata, S. (2008) A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 17323-17327. doi:10.1073/pnas.0805653105
84. Yamada, M., Matsumoto, K., Uramoto, S., Motohashi, R., Abe, H., and Taguchi, S. (2011) Lactate fraction dependent mechanical properties of semitransparent poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate)s produced by control of lactyl-CoA monomer fluxes in recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, **154**, 255-260. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.05.011
85. Yamada, M., Matsumoto, K., Nakai, T., and Taguchi, S. (2009) Microbial production of lactate-enriched poly[(R)-lactate-co-(R)-3-hydroxybutyrate] with novel thermal properties. *Biomacromolecules*, **10**, 677-681. doi:10.1021/bm8013846
86. Shozui, F., Matsumoto, K., Motohashi, R., Sun, J., Satoh, T., Kakuchi, T., and Taguchi, S. (2011) Biosynthesis of a lactate (LA)-based polyester with a 96 mol% LA fraction and its application to stereocomplex formation. *Polym. Degrad. Stab.*, **96**, 499-504. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2011.01.007
87. Song, Y., Matsumoto, K., Yamada, M., Gohda, A., Brigham, C.J., Sinskey, A.J., and Taguchi, S. (2012) Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1917-1925. doi:10.1007/s00253-011-3718-0
88. Nduko, J.M., Matsumoto, K., Ooi, T., and Taguchi, S. (2013) Effectiveness of xylose utilization for high yield production of lactate-enriched P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using a lactate-overproducing strain of *Escherichia coli* and an evolved lactate-polymerizing enzyme. *Metab. Eng.*, **15**, 159-166. doi:10.1016/j.ymben.2012.11.007
89. Matsumoto, K., Iijima, M., Hori, C., Utsunomia, C., Ooi, T., and Taguchi, S. (2018) In vitro analysis of D-lactyl-CoA-polymerizing polyhydroxyalkanoate synthase in polylactate and poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) syntheses. *Biomacromolecules*, **19**, 2889-2895.

doi:10.1021/acs.biomac.8b00454

90. Shozui, F., Matsumoto, K., Nakai, T., Yamada, M., and Taguchi, S. (2010) Biosynthesis of novel terpolymers poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s in lactate-overproducing mutant *Escherichia coli* JW0885 by feeding propionate as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 949-954. doi:10.1007/s00253-009-2100-y
91. Shozui, F., Matsumoto, K., Motohashi, R., Yamada, M., and Taguchi, S. (2010) Establishment of a metabolic pathway to introduce the 3-hydroxyhexanoate unit into LA-based polyesters via a reverse reaction of  $\beta$ -oxidation in *Escherichia coli* LS5218. *Polym. Degrad. Stab.*, **95**, 1340-1344. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.029
92. Sun, J., Matsumoto, K., Nduko, J.M., Ooi, T., and Taguchi, S. (2014) Enzymatic characterization of a depolymerase from the isolated bacterium *Variovorax* sp. C34 that degrades poly(enriched lactate-co-3-hydroxybutyrate). *Polym. Degrad. Stab.*, **110**, 44-49. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.08.013
93. 小原仁実 (2003) バイオマスから製造するポリ乳酸, *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 405-410
94. Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, **3**, 208-218. doi:10.1016/S0022-2836(61)80047-8
95. Berns, K.I. and Thomas, C.A. Jr. (1965) Isolation of high molecular weight DNA from *Hemophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.*, **11**, 476-490. doi:10.1016/S0022-2836(65)80004-3
96. Sato, H., Yanagida, F., Shinohara, T., and Yokotsuka, K. (2000) Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes in lactic acid bacteria isolated from red wine. *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 335-337. doi:10.1016/S1389-1723(00)80091-2
97. Goh, Y.J., Zhang, C., Benson, A.K., Schlegel, V., Lee, J.H., and Hutkins, R.W. (2006) Identification of a putative operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus paracasei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 7518-7530. doi:10.1128/AEM.00877-06
98. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) "Molecular cloning: A Laboratory manual, 2nd ed." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
99. BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

100. Bunch, P.K., Mat-Jan, F., Lee, N., and Clark, D.P. (1997) The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology*, **143**, 187–195. doi:10.1099/00221287-143-1-187
101. Chang, D.E., Jung, H.C., Rhee, J.S., and Pan, J.G. (1999) Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1384–1389.
102. Mat-Jan, F., Alam, K.Y., and Clark, D.P. (1989) Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J. Bacteriol.*, **171**, 342–348. doi:10.1128/jb.171.1.342-348.1989
103. Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)
104. Gu, S.A., Jun, C., Joo, J.C., Kim, S., Lee, S.H., and Kim, Y.H. (2014) Higher thermostability of L-lactate dehydrogenases is a key factor in decreasing the optical purity of D-lactic acid produced from *Lactobacillus coryniformis*. *Enzyme Microb. Technol.*, **58**, 29-35. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.02.008
105. Hiroe, A., Hyakutake, M., Thomson, N.M., Sivaniah, E., and Tsuge, T. (2013) Endogenous ethanol affects biopolyester molecular weight in recombinant *Escherichia coli*. *ACS Chem. Biol.*, **8**, 2568–2576. doi:10.1021/cb400465p
106. Tsuge, T. (2016) Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis. *Polym. J.*, **48**, 1051-1057. doi:10.1038/pj.2016.78
107. Spratt, S.K., Ginsburgh, C.L., and Nunn, W.D. (1981) Isolation and genetic characterization of *Escherichia coli* mutants defective in propionate metabolism. *J. Bacteriol.*, **146**, 1166-1169.
108. Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop II, R.M., and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, **166**, 175-176. doi:10.1016/0378-1119(95)00584-1
109. Kato, M., Bao, H.J., Kang, C.K., Fukui, T., and Doi, Y. (1996) Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by

- Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 363-370.  
doi:10.1007/s002530050697
110. De Graef, M.R., Alexeeva, S., Snoep, J.L., and de Mattos, M.J.T. (1999) The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **181**, 2351-2357
111. Matsuoka, Y. and Kurata, H. (2017) Modeling and simulation of the redox regulation of the metabolism in *Escherichia coli* at different oxygen concentrations. *Biotechnol. Biofuels*, **10**, 183 (15 pages). doi:10.1186/s13068-017-0867-0
112. 大矢裕一 (2002) ポリ乳酸をベースとした新規な生分解性高分子の合成とバイオマテリアルとしての応用, 高分子論文集, **59**, 484-498
113. Singer, M., Baker, T.A., Schnitzler, G., Deischel, S.M., Goel, M., Dove, W., Jaacks, K.J., Grossman, A.D., Erickson, J.W., and Gross, C.A. (1989) A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **53**, 1-24
114. Abe, H., Doi, Y., Fukushima, T., and Eya, H. (1994) Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3. *Int. J. Biol. Macromol.*, **16**, 115-119. doi:10.1016/0141-8130(94)90036-1
115. Tsuge, T., Yano, K., Imazu, S., Numata, K., Kikkawa, Y., Abe, H., Taguchi, S., and Doi, Y. (2005) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from fructose using wild-type and laboratory-evolved PHA synthases. *Macromol. Biosci.*, **5**, 112-117. doi:10.1002/mabi.200400152
116. Sato, S., Nomura, C.T., Abe, H., Doi, Y., and Tsuge, T. (2007) Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] formation in *Escherichia coli* from glucose through an enoyl-CoA hydratase-mediated pathway. *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 38-44. doi:10.1263/jbb.103.38
117. Jenkins, L.S. and Nunn, W.D. (1987) Genetic and molecular characterization of the genes involved in short-chain fatty acid degradation in *Escherichia coli*: the *ato* system. *J. Bacteriol.*, **169**, 42-52. doi:10.1128/jb.169.1.42-52.1987
118. Jenkins, L.S. and Nunn, W.D. (1987) Regulation of the *ato* operon by the *atoC* gene in

- Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **169**, 2096-2102. doi:10.1128/jb.169.5.2096-2102.1987
119. Kamthai, S. and Magaraphan, R. (2015) Thermal and mechanical properties of polylactic acid (PLA) and bagasse carboxymethyl cellulose (CMC<sub>B</sub>) composite by adding isosorbide diesters. In AIP Conference Proceedings, 1664:060006. doi:10.1063/1.4918424
120. Song, X., Chen, Y., Xu, Y., and Wang, C. (2014) Study on tough blends of polylactide and acrylic impact modifier. *BioResources*, **9**, 1939-1952. doi:10.15376/biores.9.2.1939-1952

# Appendix



## Appendix-1 使用培地

### 【抗生物質】

※ 下記を開放系で調製する。

- ・ アンピシリン (Amp) (100 mg/mL)

遠沈管にアンピシリンナトリウム (Wako) 1 g を量り取り、滅菌水 10 mL を加え、ボルテックスで溶解させる。

- ・ カナマイシン (Km) (50 mg/mL)

遠沈管にカナマイシン硫酸塩 (Wako) 500 mg を量り取り、滅菌水 10 mL を加え、ボルテックスで溶解させる。

- ・ テトラサイクリン (Tc) (12.5 mg/L)

遠沈管にテトラサイクリン塩酸塩 (Wako) 125 mg を量り取り、50%エタノール (滅菌水 : 100%エタノール = 1:1) 10 mL を加え、ボルテックスで溶解させる。

※ これらをクリーンベンチにてフィルター滅菌 (0.2  $\mu\text{m}$ ) し、滅菌遠沈管 (15 mL 容) で -25°C で保存する。また、これらは、マイクロチューブに 100  $\mu\text{L}$  ずつ分注しておく。

### 【誘導物質】

- ・ IPTG (イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド) (0.1 M)

遠沈管に IPTG (Wako) 238 mg を量り取り、滅菌水 10 mL を加え、ボルテックスで溶解させる。フィルター滅菌 (0.2  $\mu\text{m}$ ) を行い、滅菌遠沈管 (15 mL 容) で -25°C で保存する。

### 【発色性基質】

- ・ X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)  
 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対する発色性基質として使用する。

## 【培地組成】

- LB (lysogeny broth) 液体培地

Table A-1 の成分に蒸留水を加えて 1 L とし、pH 7.0 に調整した後、121°C、20 分オートクレーブ殺菌を行う。プラスミド維持のため、必要に応じて抗生物質のストック溶液を培地の 1/1000 量添加する。

Table A-1 LB medium (1 L)

Bacto Tryptone (Difco)	10 g
Yeast extract (Difco)	5 g
NaCl	5 g

- LB 寒天平板培地

Table A-1 の LB 培地を pH 7.0 に調整した後、1.5%濃度になるように Agar を加え、121°C、20 min オートクレーブ滅菌を行う。55~65°C まで放冷後に、必要に応じて抗生物質のストック溶液を培地の 1/1000 量添加し、混合して滅菌シャーレに 15~20 mL ずつ注ぎ、寒天平板培地を作製する。

- LB (AXI) 寒天平板培地

Table A-1 の LB 培地に、1.5%濃度になるように Agar を加え、121 °C、20 min オートクレーブ滅菌を行う。55~65 °C まで放冷後、Table A-2 に示したように X-gal (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド)、およびろ過滅菌 (0.2 μm) した IPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) とアンピシリン (Amp) を添加、混合して滅菌シャーレに 15~20 mL ずつ注ぎ、寒天平板培地を作製する。

Table A-2

	終濃度
アンピシリン (Amp)	100 μg/mL
IPTG	0.1 mM
X-gal	40 μg/mL

※ X-gal は疎水性のため、添加時に X-gal を最終濃度が 40 mg/mL となるようマイクロチューブに取り、これが 2%となるようにジメチルホルムアミドに溶解させたものを添加。

- NB (Nutrient broth) 培地

Table A-3 の成分に蒸留水を加えて 1 L とし、pH 7.0 に調整した後、試験管に 1.7 mL (1.5 mL 試験管培地の場合) ずつ分注し、シリコ栓をして 121°C で 20 分間オートクレーブ殺菌を行う。プラスミド維持のため、必要に応じて抗生物質のストック溶液を培地の 1/1000 量添加する。

Table A-3 NB medium (1 L)

		終濃度
Meat extract (極東製薬工業)	10 g	1%
Bacto peptone (Difco)	10 g	1%
NaCl	5 g	0.5%

- SOB 培地

Table A-4 の成分に蒸留水を加えて 1 L とし、pH 7.0 に調整後 121°C、20 分間オートクレーブを行う。これに別殺菌した 1/100 量の 2 M Mg<sup>2+</sup>溶液 (2 M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O + 2 M MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) を加える。

Table A-4 SOB medium (1 L)

		終濃度
Bacto Tryptone (Difco)	20 g	2.0%
Bacto Yeast extract (Difco)	5 g	0.5%
5 M NaCl	2 mL	10 mM
2 M KCl	1.25 mL	2.5 mM

- SOC 培地

SOB 培地 (2 M Mg<sup>2+</sup>が入っていないもの) (1 サンプルにつき 200 μL 使用) に、オートクレーブした 2 M Mg<sup>2+</sup>溶液と 2 M グルコース溶液を、それぞれ使用する直前に 1/100 量 (2 μL) ずつ加える。

- MRS 培地

MRS 培地 (OXOID) 52 g/L となるように蒸留水に溶解し、121°C、15 min オートクレーブ殺菌を行う。

## Appendix-2 protocols

### 【*Lb. acetotolerans* HT の植え継ぎ】

#### <培地>

- ・ 1%酢酸含有 MRS 液体培地  
10 mL MRS 液体培地に 11% CH<sub>3</sub>COOH を 1 mL 加えて作製する。

#### <培養>

- 1) 1%酢酸含有 MRS 液体培地 (10 mL) に培養液を 2% (220 μL) 接種する。
- 2) 30°C、数日間 (2~3 日間) 静置培養する。
- 3) 冷蔵保存する際は、薬包紙でシリコ栓を包む。

#### ※生育が悪いとき

- ・ 培養液を多めに接種する (3~4%)。
- ・ 一度、酢酸を添加せず培養させて、それを 1%酢酸含有 MRS 液体培地で培養する。  
(*Lb. acetotolerans* HT は酢酸耐性菌だが、生育に酢酸を必要としないので、酢酸がなくても増殖する。)

### 【*Lb. acetotolerans* HT ゲノム DNA の調製】

#### <試薬>

- ・ 0.5 M EDTA (エチレンジアミン四酢酸) (pH 8.0) : EDTA-2Na · 2H<sub>2</sub>O (エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム二水和物) 18.6 g を超純水 80 mL に溶かし、5N NaOH を用いて pH 8.0 に調整し、超純水で 100 mL にメスアップする。オートクレーブ殺菌を行う。
- ・ 50 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸) (pH 8.0) : 0.5 M EDTA (pH 8.0) を 10 倍希釈したものを用意し、121°C、20 min オートクレーブ殺菌を行う。
- ・ Lysozyme (Wako) : 0.5~1.0 mg/mL となるように加える。
- ・ Labiase (生化学工業) : 5 mg/mL となるように加える。
- ・ 10% SDS : Sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム) 30 g を超純水で溶解し、HCl で pH 7.2 に調整して 300 mL にメスアップする。121°C、20 分間オートクレーブ殺菌を行う。なお SDS は粘膜刺激性薬品であるため、計量する場合は、マスク等を着用する。
- ・ クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) : クロロホルム、イソアミルアルコールを 24 : 1 (v/v) で混合する。プラスチックを腐食させるので使用する器具に気をつける。
- ・ TE (pH 8.0) : 10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA を混合、pH 8.0 に調整し、121°C、20 min オートクレーブ殺菌を行う。非常に強い緩衝作用を持ち、DNA や RNA を溶

解する基本溶液となる。

- TE 飽和フェノール：核酸抽出用フェノール (Wako) を約 60°C で温めて溶かし、TE を加えて二層に分かれるまで混合した後、一晩放置した後、下層を使用する。
- 3 M 酢酸ナトリウム (NaOAc)：3 M 酢酸ナトリウム (酢酸ナトリウム 40.8 g を溶解させ 100 mL にしたもの) に 3 M 酢酸 (酢酸原液 12 mL を 70 mL までメスアップしたもの) を徐々に加えて pH 5.2 に調整し、121°C、20 min オートクレーブ殺菌を行う。
- 100%冷エタノール：耐熱ビンを 121°C、20 min オートクレーブ殺菌後、室温に冷ましてから 100%エタノールをそのまま入れ、-25°C で保存する。
- 70%冷エタノール：必要量の超純水を 121°C、20 min オートクレーブ殺菌する。室温に冷ましてから、エタノール濃度が 70%となるように 100%エタノールを加え、-25°C で保存する。
- 20 mg/mL Proteinase K (Wako)：滅菌水に溶解後、-20°C で保存する。

#### <操作>

- 1) *Lb. acetotolerans* HT 株を 10 mL の 1%酢酸含有 MRS 試験管培地に接種し、30°C で 24 h 培養 (静置培養) を行い、リフレッシュさせる。
- 2) 全量を 100 mL MRS 培地 (1%酢酸、20 mM DL-トレオニン含有) を入れた 300 mL 容三角フラスコに移し、30°C で一晩静置培養を行う。
- 3) 全量をあらかじめ滅菌した遠心チューブに移し、6,000 rpm、5 min、4°C で遠心分離を行う。
- 4) 上清を取り除き菌体ペレットに約 50 mL の 50 mM EDTA (pH 8.0) を加え、氷上で穏やかにかくはんし懸濁、2 回リンスを行う。(6,000 rpm、5 min、4°C の遠心分離を繰り返す)
- 5) 菌体ペレットを 1 mL の 50 mM EDTA (pH 8.0) に懸濁する。全量を 15 mL 容の滅菌遠沈管に移す (-20°C で凍結保存可)。
- 6) 5~10 mg/mL となるように lysozyme を加え、ピペッティングを行い、泡立たないように優しく懸濁する。
- 7) 37°C、2 h インキュベートする。
- 8) Labiase を 5 mg/mL となるように添加し、ピペッティングを行い、泡立たないようにやさしく懸濁する (Labiase は DNA 分解酵素を微量に含んでいるため、EDTA を用いて酵素活性を阻害させる)。
- 9) 途中で穏やかに混ぜながら 37°C、3 h インキュベートする。
- 10) 10% SDS を 200  $\mu$ L 加えて、チューブを上下逆さにしてゆっくりとよく混和する。途中で穏やかによく混ぜながら、60°C、10 min インキュベートする。
- 11) 400  $\mu$ L ずつ 3 本のマイクロチューブに分注する。
- 12) 等量の PCI (フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1)) を加える (フェノール処理)。

- 13) 穏やかに、よくかくはんし、12,000 rpm、5 min、4°C で遠心分離する。
- 14) 粘性のある水層（上層）を新しいマイクロチューブに移す。（フェノール処理を数回繰り返し、中間の白いタンパク質の層を除く）
- 15) 1/10 量（40  $\mu$ L）の 3 M NaOAc、2.5 倍量（1 mL）の 100%冷エタノールを加え、穏やかによくかくはんする（エタノール沈殿）。
- 16) -80°C で 10 min（-28°C で 30 min）保冷する。
- 17) 12,000 rpm、10 min、4°C で遠心分離する。
- 18) 1 mL の 70%冷エタノールでリンスする。
- 19) 12,000 rpm、5 min、4°C で遠心分離する。
- 20) 真空遠心装置を用い、15~30 min ペレットを乾燥させる。
- 21) 得られたペレットをそれぞれ 195  $\mu$ L の TE に溶解する。（DNA が溶けない場合は、4°C で一晩静置する）
- 22) 5  $\mu$ L の 20 mg/mL proteinase K 溶液を加えて、マイクロチューブを上下逆さにしながらゆっくりよく混ぜる。
- 23) 37°C、2 h インキュベートする。
- 24) フェノール処理を数回行い、タンパク質の除去を行う。
- 25) 1/10 量（20  $\mu$ L）の 3 M NaOAc、2.5 倍量（500  $\mu$ L）の 100%冷エタノールを加え、よく混ぜる（エタノール沈殿）。
- 26) -80°C で 10 min（-28°C で 30 min）保冷する。
- 27) 12,000 rpm、10 min、4°C で遠心分離する。
- 28) 1 mL の 70%冷エタノールでリンスする。
- 29) 12,000 rpm、5 min、4°C で遠心分離する。
- 30) 真空遠心装置を用い、15~30 min ペレットを乾燥させる。
- 31) 得られたペレットをそれぞれ 200  $\mu$ L の TE に溶解する。（DNA が溶けない場合は、4°C で一晩静置する）
- 32) アガロースゲル電気泳動を行い、ゲノム DNA の量および純度を確認する。

#### 【*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA の少量調製】

<試薬>

※*Lb. acetotolerans* HT ゲノム DNA の調製を参照

- ・ TE (pH 8.0)
  - ・ 20 mg/mL proteinase K
  - ・ CTAB-NaCl 溶液
- 
- |       |      |                       |
|-------|------|-----------------------|
| 10%   | CTAB | (セチルトリメチルアンモニウムブロマイド) |
| 0.7 M | NaCl |                       |
- 
- ・ 5 M NaCl
  - ・ クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1)

- 10%SDS
- TE 飽和フェノール
- イソプロパノール
- 70%冷エタノール

<操作>

- 1) *Pseudomonas* sp. 61-3 の単コロニーを 1.5 mL の LB 培地に植菌し、28°C で 12~18 時間振とう培養 (120 strokes/min) を行う。
- 2) 培養液をマイクロチューブに移し、6,000 rpm、3 分間遠心する。
- 3) 上清を捨て、菌体ペレットを 567  $\mu$ L の TE に懸濁する。
- 4) これに 30  $\mu$ L の 10%SDS および 3  $\mu$ L の 20 mg/mL proteinase K 溶液を加え、チューブを上下逆にしてよく混和する。
- 5) 37°C で 1 時間インキュベーションを行う。
- 6) 5 M NaCl を 100  $\mu$ L 加えて穏やかによく混和する。
- 7) CTAB-NaCl を 80  $\mu$ L 加えて穏やかによく混和する。
- 8) 65°C で 10 分間インキュベーションを行う。
- 9) クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を 700  $\mu$ L 加え約 10 分間チューブを上下逆にしてよく混和する。
- 10) 4°C、12,000 rpm、5 分間遠心する。
- 11) 粘性のある水層 (上層) を新たなマイクロチューブに移し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を等量 (~650  $\mu$ L) 加え、チューブを上下逆にして穏やかによく混和する (フェノール処理)。
- 12) 4°C、12,000 rpm、5 分間遠心する。
- 13) 粘性のある水層 (上層) を新たなマイクロチューブに移す (フェノール処理)。フェノール処理を 2、3 回繰り返す。
- 14) 得られた水層の 0.6 倍容のイソプロパノールを加え、チューブを穏やかによく振り DNA の沈殿を形成させる。
- 15) 4°C、12,000 rpm、10 分間遠心する。
- 16) 沈殿に 70%冷エタノール (-20°C) 1 mL を加えてリンスする。
- 17) 4°C、12,000rpm、5 分間遠心する。
- 18) 上清をよく取り除き、真空遠心乾燥機で約 15 分間沈殿物を乾燥させ、沈殿物を TE (pH 8.0) 100  $\mu$ L に溶解する (約 10~20  $\mu$ g の DNA が得られる)。
- 19) 100  $\mu$ L から一部分を取り、アガロースゲル電気泳動を行い、ゲノム DNA を確認する。

## 【RNA の除去】

### <試薬>

- TE
- 10 mg/mL Ribonuclease A bovine pancreas (RNase A) (DNase free)

		最終濃度
RNase A (SIGMA)	50 mg	10 mg/mL
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	0.05 mL	10 mM
5 M NaCl (pH 7.5)	0.015 mL	15 mM
滅菌水	up to 5 mL	

※まず、1 M Tris-HCl (pH 7.5)および 5 M NaCl (pH 7.5)でバッファーを作製し、それに RNase A 粉末を溶解する。マイクロチューブに分注し、100°C のヒートブロックで 15 分処理後、そのまま室温になるまでゆっくりと冷まして作製する。

- クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1)
- TE 飽和フェノール
- 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)
- 100%冷エタノール

### <操作>

- 1) ゲノム DNA の調製で得られた 100  $\mu$ L の DNA 溶液に TE (pH 8.0) 100  $\mu$ L をさらに加える。
- 2) 10 mg/mL の RNase (DNase free) を 2  $\mu$ L 添加後、37°C で 10~30 分間インキュベーションを行う。
- 3) フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を等量 (200  $\mu$ L) 加え、チューブを上下逆にして穏やかによく混和する。
- 4) 4°C、12,000 rpm、5 分間遠心する。
- 5) エタノール沈殿後、遠心分離して沈殿を得る。
- 6) 1 mL の 70% 冷エタノールで沈殿を 2 回リンスする。
- 7) 4°C、12,000 rpm、5 分間遠心する。
- 8) 上清をよく取り除き、真空遠心乾燥機で約 15 分間沈殿物を乾燥させ、100  $\mu$ L の TE に溶解する。
- 9) 得られたゲノム DNA は分光光度計およびアガロースゲル電気泳動により濃度および純度を測定、確認する。



## 【アガロースゲル電気泳動】

### <試薬>

- 電気泳動用低融点アガロース LO3 (TaKaRa)
- 50 × TAE buffer

---

2 M	Tris
2 M	酢酸
50 mM	EDTA (pH 8.0)
	超純水

---

※ 1 × TAE buffer はこれを希釈して用いる。

- EtBr ストック溶液  
10 mg/mL の溶液（市販）を 1 × TAE buffer で 1,000~2,000 倍程度に希釈し、遮光で室温保存。EtBr は発ガン性物質のため、必ず手袋をして取り扱うこと。
- 分子量マーカー Loading Quick  $\lambda$ /HindIII digest (TOYOBO)
- 色素 Loading Dye (TOYOBO)

### <ゲルの作製>

アガロースゲル 1.2 g を三角フラスコに量り取り、1 × TAE buffer 150 mL を加え、電子レンジで加熱融解させる（ゲル濃度 0.8%）。アガロース溶液を注ぎ、コームをセットして放冷し固化させる。ゲル使用時に、1 × TAE buffer を加える。

### <操作>

- 1) サンプル溶液 5~8  $\mu$ L に色素 2  $\mu$ L を混合し、ウェルにアプライする。
- 2) 10  $\mu$ L の分子量マーカーとともに 100 V、約 30 min 泳動する。
- 3) 電気泳動装置からゲルをそっとはずし、EtBr に 15 min 振とう染色後、蒸留水で
- 4) 15 min 穏やかに振とう洗浄する。
- 5) UV（短波長 254 nm）でバンドを確認し、写真を撮る。

## 【PCR 産物の精製】

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いた。

キットのプロトコールに従い操作。

## 【アガロースゲルからの DNA 抽出】

QIAGEX II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いた。

キットのプロトコールに従い操作。

### 【RNA 除去および制限酵素処理】

#### <試薬>

- 10 mg/mL RNase A (DNase free)
- 制限酵素
- 10 × buffer
- 3 M NaOAc
- 100%冷エタノール
- 70%冷エタノール

#### <操作>

- 1) プラスミド溶液を数  $\mu\text{L}$  とり、滅菌水を加えて 19  $\mu\text{L}$  にする。
- 2) 10 mg/ml RNase を 1  $\mu\text{L}$  加える。
- 3) 37°C、10 min インキュベートする。
- 4) RNA 除去処理後、それぞれに 10 × buffer を 20  $\mu\text{L}$  添加し、滅菌水 169  $\mu\text{L}$  を加え、これに制限酵素を各 1  $\mu\text{L}$  加えて、穏やかに混和する (計 200  $\mu\text{L}$ )。
- 5) 37°C で 4 h ~ 一晩 インキュベートする。
- 6) 制限酵素処理後、3 M NaOAc を 20  $\mu\text{L}$  と、500  $\mu\text{L}$  の 100%冷エタノールを加え、エタノール沈殿を行う。
- 7) 4°C、12,000 rpm、10 分間遠心分離して沈殿を得る。
- 8) 1 mL の 70%冷エタノールで沈殿をリンスする。
- 9) 上清をよく取り除き、真空遠心乾燥機で約 15 分間沈殿物を乾燥させ、ライゲーションに用いる。

### 【TA クローニング (T-vector pMD20 とライゲーションする場合)】

※ PrimeSTAR シリーズなどの  $\alpha$  型 DNA ポリメラーゼにより増幅された PCR 産物の場合は、Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (TaKaRa) を用いて 3'末端に dA を付加した後、T-vector pMD20 とライゲーションする。

#### <操作>

- 1) dA 付加を行った PCR 産物 (滅菌水を加え計 4  $\mu\text{L}$  になるように調製) に T-vector pMD20 を 1  $\mu\text{L}$  加え混和する。
- 2) サンプルと同量 (5  $\mu\text{L}$ ) の Ligation Mighty Mix を加える (計 10  $\mu\text{L}$ )。
- 3) 16°C で 2 h 以上ライゲーションを行う。

### 【ライゲーション (pT7Blue-T vector とライゲーションする場合)】

#### <操作>

- 1) PCR 産物を制限酵素処理した DNA 断片の乾燥物に 5  $\mu$ L の滅菌水を加え、溶解した後、その溶液に pT7Blue T-vector を 1  $\mu$ L 加え混和する。
- 2) サンプルと同量 (5  $\mu$ L) の Ligation high Ver. 2 (TOYOBO) を加える (計 10  $\mu$ L)。
- 3) 16°C で 2 h 以上ライゲーションを行う。

### 【ライゲーション (pUC118 *HincII*/BAP とライゲーションする場合)】

#### <操作>

- 1) Mighty Cloning Reagent Set <Blunt End> (TaKaRa) を用いて PCR 産物をリン酸化 (kination) 反応を行い、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製を行う。
- 2) 精製した DNA 溶液 5  $\mu$ L に pUC118 *HincII*/BAP (50 ng/ $\mu$ L) を 1  $\mu$ L 加え、混合する。
- 3) Ligation Mighty Mix を 6  $\mu$ L 加え、穏やかに混合する。
- 4) 16°C で 1 h 以上ライゲーションを行う。

### 【ゲノム DNA の制限酵素消化とセルフライゲーション】

#### <試薬>

- ・ 制限酵素
- ・ クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)
- ・ TE 飽和フェノール
- ・ 3M NaOAc
- ・ 100%エタノール
- ・ 70%エタノール
- ・ Ligation High Ver.2 (TOYOBO)
- ・ TE (pH8.0)

#### <制限酵素処理>

- 1) 2  $\mu$ g の *Lb. acetotolerans* HT 株ゲノム DNA を 4  $\mu$ L の制限酵素を用いて 400  $\mu$ L スケールで一晩制限酵素処理を行う。
- 2) 等量の PCI (フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1)) を加え、フェノール処理を行う。
- 3) 穏やかに、よくかくはんし、12,000 rpm、5 min、4°C で遠心分離する。
- 4) 上清を新しいマイクロチューブに移す。

- 5) 1/10 量 (10  $\mu$ L) の 3 M NaOAc、2.5 倍量 (250  $\mu$ L) の 100%冷エタノールを加え、よく混ぜる (エタノール沈殿)。
- 6) -80°C で 10 min 保冷する。
- 7) 12,000 rpm、10 min、4°C で遠心分離する。
- 8) 1 mL の 70%冷エタノールでリンスする。
- 9) 12,000 rpm、5 min、4°C で遠心分離する。
- 10) 真空遠心装置を用い、15~30 min ペレットを乾燥させ、5  $\mu$ L の滅菌水に溶解する。

<セルフライゲーション>

- 1) 前項で制限酵素処理した DNA 溶液に Ligation High Ver.2 (TOYOBO)を 5  $\mu$ L 加え 16°C で一晩インキュベートする。
- 2) 1/10 量 (10  $\mu$ L) の 3 M NaOAc、2.5 倍量 (250  $\mu$ L) の 100%冷エタノールを加え、よく混ぜる (エタノール沈殿)。
- 3) -80°C で 10 min 保冷する。
- 4) 12,000 rpm、10 min、4°C で遠心分離する。
- 5) 1 mL の 70%冷エタノールでリンスする。
- 6) 12,000 rpm、5 min、4°C で遠心分離する。
- 7) 真空遠心装置を用い、15~30 min ペレットを乾燥させ、終濃度 10  $\mu$ g/mL DNA 溶液となるように 200  $\mu$ L の滅菌水に溶解する。

【プラスミドの単離 (アルカリ SDS 法)】

<試薬>

・ Solution I (GTE 溶液) ストック

50 mM glucose	1.8 g
25 mM Tris-HCl (pH 8.0)	5 mL
10 mM EDTA (pH 8.0)	4 mL

計 200 mL

121°C、20 min オートクレーブする。室温保存。

・ Solution II 試験管 (1.5 mL) 1 本分

0.2 N NaOH	8 $\mu$ L
10% SDS	20 $\mu$ L
滅菌水	172 $\mu$ L

計 200  $\mu$ L

使用時に調製する。

・ Solution III (3 M K, 5 M 酢酸) ストック	
5 M 酢酸カリウム	60 mL
氷酢酸	11.5 mL
超純水	28.5 mL
計 100 mL	

121°C、20 分でオートクレーブする。室温保存。

#### <操作>

- 1) プラスミドを保持した大腸菌の単コロニーを 1.5 mL の LB 培地（必要に応じて抗生物質を入れる）に植菌し、37°C で一晩振とう培養（120 strokes/min）を行う。
- 2) 培養液をマイクロチューブに移し 6,000 rpm、3 分間遠心する。
- 3) 菌体ペレットを 100  $\mu$ L の Solution I に懸濁して室温で 5 分間放置する。
- 4) 200  $\mu$ L の Solution II を加え、チューブを上下逆にして穏やかによく混和し、氷上で 5 分間放置する。
- 5) 150  $\mu$ L の Solution III を加え、同様に穏やかによく混和し、氷上で 5 分間放置する。
- 6) 12,000 rpm、10 分間遠心後、上清を新たなマイクロチューブに移してフェノール処理を数回繰り返す。
- 7) コピー数の少ない広宿主域ベクターなどの場合は、純度よく抽出するために 3 回行った方がよい。
- 8) フェノール処理後、上層を新しいチューブに移し、2.5 倍量の冷エタノールを加えて混和し、-80°C で 10 分間放置した後、4°C、12,000 rpm、10 分間遠心する。
- 9) 上清を取り除き、70% 冷エタノール (-25°C) 1 mL でリンス後、4°C、12,000 rpm、5 分間遠心する。
- 10) 上清をよく取り除き、真空遠心乾燥機で約 15 分間沈殿物を乾燥させ、沈殿物を適量の TE もしくは滅菌水に溶解させる。このとき、試験管培地（1.5 mL）1 本あたり、pBluescript II KS<sup>+</sup>などの場合は 20  $\mu$ L に溶解させるとよい。

#### 【プラスミドベクターのアルカリフォスファターゼ処理（脱リン酸処理）】

#### <試薬>

- ・ 10  $\times$  buffer
- ・ CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) (TOYOBO)
- ・ 3 M NaOAc
- ・ 100%冷エタノール
- ・ 70%冷エタノール

## <操作>

### 5'突出末端の場合

- 1) 制限酵素で消化したプラスミドベクターの乾燥ペレットを滅菌水 44  $\mu\text{L}$  に溶解した後、5  $\mu\text{L}$  の 10 $\times$  buffer、1  $\mu\text{L}$  の CIAP を加える。
- 2) 37°C、1 h インキュベートする。
- 3) 反応終了後、滅菌水で 200  $\mu\text{L}$  にし、等量 (約 200  $\mu\text{L}$ ) のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、かくはんする。
- 4) 12,000 rpm、10 min 遠心分離する。
- 5) 上清を新しいマイクロチューブに移し、エタノール沈殿を行う。
- 6) エタノール沈殿後、真空遠心乾燥機で約 15 min 沈殿物を乾燥させ、ライゲーションに用いる。

### 平滑末端及び 3'突出末端の場合

- 1) 制限酵素で消化したプラスミドベクター (pBBR1MCS-2) の乾燥ペレットを滅菌水 170  $\mu\text{L}$  に溶解した後、20  $\mu\text{L}$  の 10 $\times$  CIAP buffer、10  $\mu\text{L}$  の CIAP を加える。
- 2) 37°C、30 min インキュベートする。
- 3) 50°C、1 h インキュベートする。
- 4) 反応終了後、等量 (約 200  $\mu\text{L}$ ) のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、かくはんする。
- 5) 12,000 rpm、10 min 遠心分離する。
- 6) 上清を新しいマイクロチューブに移し、1/10 倍量 (20  $\mu\text{L}$ ) の 3 M NaOAc と 2.5 倍量 (500  $\mu\text{L}$ ) の 100% 冷エタノールを加えて混和し、-80°C で 10 min 放置した後、12,000 rpm、10 min、4°C 遠心分離する。
- 7) 上清を取り除き、70% 冷エタノール 1 mL でリンス後、4°C、12,000 rpm、5 min 遠心する。
- 8) 上清をよく取り除き、真空遠心乾燥機で約 15 min 沈殿物を乾燥させ、ライゲーションに用いる。

### 【Kination 反応 (平滑末端および 3'突出 2 本鎖 DNA のリン酸化)】

T4 Polynucleotide Kinase (TOYOBO) を使用

#### <試薬>

- Denaturing buffer
- 試薬 A

10 $\times$ Blunt End Kinase Buffer	10 $\mu\text{L}$
ATP	1 mM
T4 Polynucleotide kinase	1 $\mu\text{L}$
滅菌水	up to 100 $\mu\text{L}$

- TE 飽和フェノール
- クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1)

<操作>

- 1) 基質 DNA 5~20 pmol に Denaturing buffer を加えて 75  $\mu$ L にする。
- 2) 90°C、2 min 加熱する。
- 3) 氷上で急冷する。
- 4) 試薬 A を加える。
- 5) 37°C、60 min 加熱する。
- 6) 90°C、2 min 加熱する。
- 7) 室温までゆっくり下げる。
- 8) 等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を加え、よくかくはんする (フェノール処理)。
- 9) 12,000 rpm、5 分間遠心分離する。
- 10) 8)、9)を数回 (3 回以上) 繰り返す。
- 11) 上層 (水層) を新しいマイクロチューブに移し、エタノール沈殿を行う。
- 12) エタノール沈殿後、真空遠心乾燥機で約 15 分間乾燥し、沈殿物を適量の滅菌水 (10  $\mu$ L) に溶解する (その後のライゲーションなどに用いるのであれば、少量の滅菌水がよい)。

【T4 DNA Polymerase 処理 (DNA の平滑化)】

<試薬>

- T4 DNA Polymerase (TOYOBO)
- 10  $\times$  buffer
- 2 mM dNTPs

<操作>

- 1) 制限酵素を行ったプラスミドの乾燥ペレットを 21.5  $\mu$ L に溶解した後、10  $\times$  buffer 2.5  $\mu$ L、2 mM dNTPs 0.5  $\mu$ L を加え、最後に T4 DNA Polymerase を 0.5  $\mu$ L を加える
- 2) 37°C、2h インキュベートする。(平滑化が終了すると、しばらくはアイドリング状態となるが dNTPs が消費され尽くすと DNA の分解が進行するので dNTPs の量と反応時間に気をつける)。
- 3) 滅菌水を加え、全量を 200  $\mu$ L とする。
- 4) 等量の PCI (フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1)) を加えかくはんする。
- 5) 12,000 rpm、5 min、遠心分離する。

- 6) 上清を新しいマイクロチューブに移し、エタノール沈殿を行う。
- 7) エタノール沈殿後、真空遠心乾燥機で約 15 min 沈殿物を乾燥させライゲーションに用いる。

### 【大腸菌のコンピテントセルの調製】

#### <試薬>

- LB 液体培地
- SOB 培地
- Transformation Buffer (TB)

Table A-5 の試薬を超純水に懸濁後、5 N KOH（または HCl）にて pH 6.7-6.8 に調整する。（低 pH では白濁状態だが、pH 調整によって溶解する。）

pH 調整後、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  を添加、溶解し、液量をメスアップする。

0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて滅菌し、4°C で保存する（1~2 日）。

Table A-5 Transformation Buffer

Components	Final Concentration	Volume
PIPES	10 mM	3.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ( $\text{CaCl}_2$ )	15 mM	2.2 g (1.66 g)
KCl	250 mM	18.6 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	55 mM	10.9 g
超純水		950 mL

Up to 1 L

- 2M  $\text{Mg}^{2+}$  溶液 : 2 M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2 M  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  調整後、121°C、20 min オートクレーブ殺菌する。
- ジメチルスルホキシド (DMSO) (Wako)

#### <操作>

- 1) 大腸菌を LB 寒天平板培地にストリークし、シングルコロニーを形成させる。
- 2) LB 液体培地（必要に応じて抗生物質を添加）に大腸菌を接種し、37°C で一晩培養する。
- 3) 50 mL SOB 培地の入った坂口フラスコ（500 mL 容）に前培養液を 500  $\mu\text{L}$ （1%）接種する。
- 4) 18°C で 19~50 時間、28°C で約 4 時間を目安に激しく振とう培養（130 strokes/min）を行う。
- 5)  $\text{OD}_{600}=0.4\sim 0.8$  に達したら培養を止め直ちに、氷中で約 10 分間冷却する。
- 6) 冷却しておいた滅菌遠心管に培養液を入れ、3,000 rpm, 15 min, 4°C で遠心分離



- し、菌体を回収する。
- 7) クリーンベンチ内で上清を捨て、培養液の 1/3 容量 (坂口フラスコ 1 本につき 15 mL) の氷冷した TB を加え氷上で穏やかにかくはんしながら懸濁させる。さらに 10 分間氷冷する。
  - 8) 3,000 rpm, 15 min, 4°C で遠心分離し、クリーンベンチ内で菌体を回収する。
  - 9) 上清を除いたあと、培養液の 1/12.5 容量 (坂口フラスコ 1 本につき 4 mL) の氷冷した TB に懸濁し、最終濃度が 7%になるように (坂口フラスコ 1 本につき 300  $\mu$ L) DMSO (ジメチルスルホキシド) を添加し、さらに 10 分間氷冷する。
  - 10) 110  $\mu$ L ずつ滅菌したマイクロチューブに分注後、直ちに液体窒素に浸し、凍結させる。
  - 11) -80°C で保存。

### 【形質転換】

#### <試薬>

- ・ LB (AXI) 寒天培地
- ・ SOB 培地
- ・ SOC 培地

#### <操作>

- 1) プラスミドを、5 min 氷冷する。
- 2) 凍結していたコンピテントセル (*E. coli* JM109 など) を融解後、直ちにプラスミドに加える。
- 3) 氷中に 30 min 放置する。
- 4) 42°C で正確に 90 sec のヒートショックを行う。
- 5) 氷中で 2 min 急冷する。
- 6) 200  $\mu$ L の SOC 培地を加え、穏やかに懸濁する。
- 7) 37°C で振とうさせながら、1 h インキュベートする。
- 8) 全量適当な抗生物質あるいは誘導物質を含んだ LB 寒天平板培地にプレーティングする。
- 9) 37°C で一晩培養する。

## 【DNA シークエンシング】

### 《DNA シークエンシング用プラスミド抽出》

#### FlexiPrep Kit 使用 (GE Healthcare)

##### <試薬>

- ・ LB 試験管培地
- ・ FlexiPrep Kit (GE Healthcare)
- ・ 2-プロパノール (関東化学)
- ・ 5 M NaCl
- ・ 100%冷エタノール
- ・ 70%冷エタノール
- ・ TE (pH 8.0)

##### <操作>

- 1) ストリークしたプレートから 1 サンプルにつき 4 本の 1.5 mL LB 試験管培地 (必要に応じて抗生物質を添加) に植菌する。
- 2) 37°C で一晩振とう培養する (120 strokes/min)。
- 3) 1.5 mL ずつマイクロチューブに移し、6,000 rpm、3 min 遠心分離を行う。
- 4) DNA シークエンシング用プラスミド抽出キット (FlexPrep Kit) の Solution I を 200  $\mu$ L 加え、ピペッティングにより懸濁する。
- 5) Solution II を 200  $\mu$ L 加え、チューブを転倒混和し、室温で 5 min 放置する。
- 6) Solution III を 200  $\mu$ L 加え、チューブを転倒混和し、室温で 5 min 放置する。
- 7) 12,000 rpm、10 min 遠心分離し、上清を新しいマイクロチューブに移す。
- 8) 上清に 0.7 倍量 (420  $\mu$ L) の 2-プロパノールを加え、2~3 秒ボルテックスにかけ、室温で 10 min 放置する。
- 9) 12,000 rpm、10 min 遠心分離する。
- 10) 沈殿を取らないように、マイクロピペットで注意深く上清を完全に取り除く。
- 11) マイクロチューブのふたを開け、真空遠心乾燥機で 30 min 乾燥させる。
- 12) Sephaglas FP のボトルを、円を描くようによく振り沈殿物を懸濁し、150  $\mu$ L を乾燥ペレットに加え、ペレットが懸濁するまでボルテックスにかける。
- 13) 12,000 rpm、1 min 遠心分離し、上清をマイクロピペットで除く。
- 14) ペレットに 200  $\mu$ L の wash buffer を加え、ボルテックスにより懸濁する。
- 15) 12,000 rpm、1 min 遠心分離し、上清をマイクロピペットで除く。
- 16) ペレットに 300  $\mu$ L の 70%冷エタノールを加え、ボルテックスにより懸濁する。
- 17) 12,000 rpm、1 min 遠心分離し、上清をマイクロピペットで除く。
- 18) 乾燥しやすいように、マイクロチューブをボルテックスにかけ、ペレットを壁面にくっつける。ふたを開けて 37°C のインキュベーター内でペレットを乾燥させる。
- 19) ペレットに 50  $\mu$ L の TE を加え、ボルテックスにより懸濁し、1 min 毎にボルテ

ックスをかけながら室温で 5 min 放置する。

- 20) 12,000 rpm、1 min 遠心分離をし、上清を新しいマイクロチューブに移す。
- 21) 19)、20)の操作をもう一度行い、上清を新しいマイクロチューブに移す (2本のマイクロチューブを1本にまとめる)。
- 22) ペレットに 100  $\mu$ L の TE を加え、19)、20)の操作をもう一度行う。
- 23) 12,000 rpm、10 min 遠心分離をし、上清を新しいマイクロチューブに移す。
- 24) この操作を数回 (3 回以上行うとよい) 繰り返し、完全に Sephaglas を取り除く。
- 25) エタノール沈殿を行い、真空遠心乾燥機を用い、15~30 min ペレットを乾燥させる。
- 26) 適量の TE に溶解し、分光光度計を用いて DNA 濃度を測定する。

#### 《DNA シークエンシング用サーマルサイクリング反応と解析》

[NEN Global Edition IR<sup>2</sup> System, LIC4200L (LI-COR) 使用の場合]

##### <試薬>

- Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB)
- IRD800-labeled primer (M13 Forward、M13 Reverse) (日清紡)
- IR<sup>2</sup> Stop Solution (LI-COR)
- KB<sup>Plus</sup>3.7% Gel Matrix (LI-COR)
- KB<sup>Plus</sup>5.5% Gel Matrix (LI-COR)
- 10% APS : 過硫酸アンモニウム 0.1 g を 1 mL の超純水に溶解し、ボルテックスでよくかくはんする。4°C、遮光保存で 2 週間使用可能。
- TEMED (*N, N, N', N',*-Tetramethylethylenediamine) (Bio-Rad)
- 5 × TBE buffer : Tris 54 g、ホウ酸 27.5 g、0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 mL を超純水に溶解し、1 L に調製する。
- 0.8 × TBE buffer : 5 × TBE buffer を 6.25 倍希釈して作製する。

##### <ゲルの作製>

Table A-6 の組成でゲルを作製する。

Table A-6

	66 cm	41 cm
スペンサーの厚さ	0.2 mm	0.2 mm
KB <sup>Plus</sup> Gel Matrix	3.7% 40 mL	5.5% 30 mL
10% APS	230 $\mu$ L	200 $\mu$ L
TEMED	23 $\mu$ L	20 $\mu$ L
泳動用 buffer	0.8 × TBE	0.8 × TBE
泳動時間	14 h	9 h

<DNA シークエンシング用サーマルサイクリング反応と解析>

- 1) マスターミックス用チューブに次の試薬、サンプルを入れて混合し、スピンドウンする (Table A-7)。まず ThermoSequenase polymerase 以外のものを入れたら一旦混ぜ、スピンドウンする。酵素を扱うときは、保冷ボックス上で行う。

Table A-7 Components of reaction mixture

Coponents	Volume (μL)
Templelate DNA (200~400 fmol)	X
IR800 Dye labeled Primer (1.0 pmol/ml)	1.0
Reaction Buffer	1.0
ThermoSequenase polymerase	1.0
滅菌水	up to 8.5

※ 濃く短く (約 500~600 bp) 読む場合には、dNTPs は加えず、長く (800 bp 以上) 読みたい場合には、dNTPs 1.0 μL を加え、滅菌水でメスアップする。また、DNA が二次構造を取り、その先を読むことができない場合には、DMSO (上限 5%) を添加すると良い。

- 2) 各ターミネーション反应用チューブ A/C/G/T の各ターミネーションミックスチャー (ddA、ddC、ddG、ddT) を 2.0 μL ずつ分注する。
- 3) 1) で調製したマスターミックスを 2.0 μL ずつターミネーション反应用チューブに分注する。
- 4) 3) をサーマルサイクラーにセットし、下記反応プログラムでサーマルサイクラーにかける (Table A-8)。

Table A-8 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	95°C	5 min
Denature	95°C	30 sec
Anneal	50°C	15 sec
Extend	70°C	50 sec (to step 2, x 30)
Cool	4°C	∞

- 5) 反応プログラムが終了したら、各チューブに IR<sup>2</sup> Stop Solution を 2.0 μL ずつ分注する。
- 6) 5) を 92°C、2 min 熱変性させ、直ちに氷冷する。
- 7) あらかじめ作製しておいた電気泳動用ゲルに、6) を 1 μL ずつアプライし、泳動 (66 cm ゲルは 14 h、41 cm ゲルは 9 h) 行う。得られた DNA の塩基配列について、Genetyx-Mac ソフトウェア (ゼネティックス) により解析し、NCBI BLAST

検索により相同性検索を行う。

[DTCS クイックスタートキット (BECKMAN COULTER) を用いた DNA シークエンシング (GenomeLab GeXP/CEQ System) の場合]

<試薬>

- ・ マスターミックス
- ・ シークエンスプライマー (1.6 pmol/μL)
- ・ グリコーゲン (20 mg/mL) : シークエンス反応後、エタノール沈殿に使用
- ・ サンプルローディングソリューション (SLS) : シークエンス産物の精製後に使用
- ・ Mineral Oil
- ・ 100%エタノール
- ・ 70%エタノール
- ・ 3M NaOAc
- ・ 100mM Na<sub>2</sub>-EDTA (pH8.0)

<操作>

\* スーパーコイル状のプラスミド DNA の反応効率を上げるために、シークエンス反応前にプレヒートを行い、「ニック」を入れ、スーパーコイルの状態を緩和する。

- 1) PCR チューブに DNA テンプレートと滅菌水を取り、サーマルサイクラーでプレヒート処理を行う。

Components	Volume (μL)
Templete DNA (50 fmol)	X
滅菌水	Up to 5

90°C、1 min プレヒートさせ、直ちに氷冷する

- 2) プレヒートしたテンプレートにプライマー、マスターミックスを加え、下記反応プログラムでサーマルサイクリングを行う (Tables A-9 and A-10)。

Table A-9 Components of reaction mixture

Components	Volume (μL)
Templete Pre-Heated DNA (50 fmol)	5
DTCS マスターミックス	4
Primer* (1.6 pmol/mL)	1
Total	10

\* Primer: M13 primer RV, M13 primer M4

Table A-10 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	96°C	2 min
Denature	96°C	20 sec
Anneal	50°C	20 sec
Extend	60°C	3 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	∞

- 3) Stop Solution をサンプル+1 の数量分調製する。

Stop Solution/1sample (要時調製)

Components	Volume (μL)
3 M NaOAc	1
100 mM Na <sub>2</sub> -EDTA	1
20 mg/mL-Glycogen	0.5
Total	2.5

- 4) 1.5 mL チューブに Stop Solution を 2.5 μL ずつ分注する。
- 5) シークエンス反応液を全量、Stop Solution を分注したチューブに移し、軽く混和する。
- 6) 30 μL の 100%エタノールを加え転倒混和する。
- 7) ただちに、14,000 rpm、15 min、4°C で遠心する。  
\*シークエンスサンプルのエタノールへの暴露は最小限にする。
- 8) 上清をオートピペッターで取り除き、200 μL の 70%エタノールで、14,000 rpm、2 min、4°C で遠心し、2 回リンスする。  
\*沈殿物を吸わないように気をつける。
- 9) 真空遠心装置を用い、3~5 min ペレットを乾燥させる。乾燥させ過ぎに注意する。
- 10) サンプルローディングソリューション (SLS) を 30 μL 加え、溶解する。
- 11) SLS に溶解させたサンプル全量をサンプルプレートに移し、Mineral Oil を各ウェルに 1 滴ずつ滴下する。空気を入れないように注意する。
- 12) GenomeLab GeXP/CEQ System にて解析を行う。

## 【ガスクロマトグラフィー (GC) によるポリマーの分析】

### <集菌>

- 1) 培養後、培養液を遠心管に移し、フラスコは蒸留水で共洗いする。
- 2) 冷却遠心機で、4°C、7,000 rpm、10 分間遠心分離する。
- 3) 上清を捨て、蒸留水を遠心管の中のペレットを崩すように加えていく。その後、蒸留水を 100 mL 程度入れ、懸濁する。
- 4) 4°C、7,000 rpm、10 分間遠心分離する。
- 5) 上清を捨てる。
- 6) 2)~4)をもう一度繰り返す。
- 7) 少量の蒸留水で遠心管のペレットを崩し、ピペッティングで懸濁する。
- 8) あらかじめ重量を量っておいたマルエム容器に移す。
- 9) -80°C で 4 時間以上凍結させ、凍結乾燥機で乾燥させる (2 日程度)。

### <測定サンプルの調整 (メタノリシス) >

- 1) 乾燥菌体約 30 mg (蓄積率が低いときは 40-60 mg) をねじ口試験管に入れる。
- 2) 1.7 mL のメタノールと 0.3 mL の濃硫酸 (硫酸メタノール : 2 mL) とクロロホルム 2 mL を加え、口を密封した後に 100°C、140 分メタノリシスを行う (途中 30 分毎にかくはんする)。
- 3) 室温まで放冷し、1 mL の蒸留水を加えて 1 分間激しくかくはんする。
- 4) 15~20 分静置後、二層に分離した下層 (クロロホルム層) をパスツールピペットで分取し、内部標準物質として等量の 0.1%カプリル酸メチルのクロロホルム溶液と混合する (0.5 mL ずつ計 1 mL)。これをガスクロマトグラフィーに供する。

### <ガスクロマトグラフィー>

#### ・ ガスクロマトグラフ装置

ガスクロマトグラフ装置は GC-17A (Shimadzu) を、カラムに InertCap 1 (0.25 mm I.D×30 m, 0.4 mm; GL Sciences) を用いて水素イオン化検出器により検出する。GC 面積の積分には、C-R7A plus CHROMATOPAC (Shimadzu) を用いる。GC による測定条件は以下のように設定する (Tables A-11 and A-12)。

Table A-11 (温度・時間設定)

ディテクター温度	(DET. TEMP)	280°C
インジェクター温度	(INJ)	250°C
カラムオープン初期温度	(INT. TEMP)	100°C
初期温度保持時間	(INT. TIME)	0 min
カラム昇温速度	(PROG. RATE)	8°C/min
カラム最終温度	(FINAL TEMP)	280°C
昇温最終温度保持時間	(FINAL TIME)	0 min

Table A-12 (ガス流量)

Air	400 mL/min
H <sub>2</sub>	40 mL/min
He	30 mL/min

- サンプル注入量  
サンプルの注入にはマイクロシリンジまたはオートインジェクタ AOC20i を用い、一回の注入量は 1 μL とする。
- 3-ヒドロキシアルカン酸メチルの保持時間  
各ピークの積分値をモル相対値に変換するためには、相対感度の逆数(補正係数)が必要である。表に各種 3-ヒドロキシアルカン酸メチルの補正係数を示す (Table A-13)。

Table A-13

	保持時間 (min)	補正係数
3-hydroxyalkanoate	2.813	1.24
3-hydroxybutyrate (C4)	3.284	1.00
3-hydroxyoctanoate (C8)	7.785	0.28
3-hydroxydecanoate (C10)	11.058	0.28
3-hydroxy-5- <i>cis</i> -dodecenoate (C12')	14.061	0.28
3-hydroxydodecanoate (C12)	14.280	0.28

3つのピークの a, b, c の積分値がそれぞれ A, B, C で、補正係数が X, Y, Z であった場合、a のモル分率を次式で求める。

$$a \text{ のモル分率 (mol\%)} = \frac{(A \times X)}{(A \times X + B \times Y + C \times Z)} \times 100$$

菌体内のポリエステル含率を求めるにあたっては、カプリル酸メチルを内部標準物質として用いる。カプリル酸メチルの保持時間は 5.86 min である。その結果、得られたクロマトグラムに 3つのピーク a, b, c が見られ、その積分値が A, B, C であり、カプリル酸メチルのピークの積分値が S であったとすると、菌体内ポリエステル含率 P は次式で求められる。



$$P \text{ (wt\%)} = k \times \frac{(A \times X + B \times Y + C \times Z)}{m \times s} \times 100$$

k はあらかじめポリエステル含率がわかっている菌体から決定した定数 (5.4)、m はサンプルをつくる時に用いた乾燥菌体重量 (mg) である。

#### 【ポリマーの抽出】

- 1) 培養により得られた乾燥菌体を乳鉢で細かくすり潰す (菌体同士がくっついてしまうこともあるので、クロロホルムが浸透できる程度まで潰す)。
- 2) 1 L のクロロホルムにすり潰した乾燥菌体 (今回は約 6.48 または 5.73 g ; 平均ポリマー蓄積率 2.9 および 1.5 wt%) を少量ずつ添加し、アルミホイルでフタをして室温で 48 時間以上かくはんさせてポリマーを抽出させる (ドラフト内で行う)。
- 3) 抽出液を 0.5  $\mu\text{m}$  の PTFE 膜を用いて吸引ろ過して残渣を取り除く。ろ液はナスフラスコに回収する。
- 4) ろ液をエバポレーター (約 40°C) を用いて、約 2 mL (粘性が出てくるまで) になるまで濃縮する。または、ビーカーに移し、完全に乾固させる。
- 5) 濃縮液を 1 L のメタノールに駒込ピペットを用いて少量ずつ滴下し、緩やかにかくはんしながら再沈殿させ、滴下終了後も一晩スターラーで穏やかにかくはんする。
- 6) ビーカーに乾固させた場合は、ビーカーにメタノールを加える。
- 7) 沈殿が生じたメタノール溶液を再び 0.5  $\mu\text{m}$  の PTFE 膜を用いて吸引ろ過し、フィルターの上に残ったポリマーをバイアルに移し、キムワイプをふたのようにかぶせ、ドラフト内で風乾させてポリエステルを得る。

#### 【ポリマーのソルベントキャストフィルムの作製】

- 1) 乾燥菌体から抽出したポリエステルは、クロロホルムに、2% (w/v) になるように溶かす (今回は 49.9 mg)。あらかじめ、ビーカーにクロロホルムを入れておき、スターラーでかくはんしながら少しずつポリマーを加えて溶解させる。
- 2) スターラーで攪拌させた状態で、一晩放置する。一晩経過後、白濁していたクロロホルム溶液が、透明の液体となる。
- 3) ポリマーに混在する不純物を取り除くためにパスツールピペットにキムワイプを細かく切ったもの (今回は、2×2 cm) をつめて、簡易フィルターとし、20 mL のクロロホルム溶液を、フィルターに通しながら直接シャーレ (直径 9 cm) へ入れる (抽出ポリマーには、ゴミや、ろ過に使用した PTFE 膜が混入していると

考えられるため、この簡易フィルターによりそれを取り除く。市販のフィルターでは目詰まりを起こしやすい)。このときに、泡が入らないように注意する。

- 4) または、スライドガラスの上に 10 mm × 3 mm 以上になるように滴下する（今回は 7 枚作製）。
- 5) その後、シャーレにアルミホイルでふたをして、つまようじにて小さな穴を 4~5 個あけて（直径 4 cm シャーレの場合には 3 個）、デシケーター（あらかじめよく焼いたシリカゲルを入れておく）に移す。
- 6) スライドガラスの場合は、ゴミが入らないように、容器を上からかぶせる。
- 7) サンプルを振動させないようにクロロホルムを少しずつ蒸発させ、デシケーター内で 2 週間以上エイジング（結晶化）させて目的のフィルムを得る。

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、丁寧なご指導、ご助言を頂きました、熊本県立大学環境共生学部食健康科学科食品バイオ工学研究室の松崎弘美教授に深く感謝申し上げます。学部生の時から、学会発表など多くの貴重な経験を与えてくださり、博士課程への進学および研究全般にわたり多大なご支援を賜り、とても感謝いたしております。また、本研究の遂行にあたり、ご多忙な中、丁寧なご指導、ご助言を賜りました、近畿大学産業理工学部生物環境化学科応用生物工学研究室の田中賢二教授、ガスクロマトグラフィーの分析操作をはじめ、多大なご支援、ご助言を頂きました本学環境共生学部食健康科学科食品分析学研究室の白土英樹教授に心より感謝いたします。乳酸ベースポリマーの合成に関してご指導、ご助言を賜りました、東京農業大学生命科学部分子生命化学科分子機能解析学分野生命高分子化学研究室の田口精一教授、北海道大学大学院工学研究院応用化学部門生物工学分野バイオ分子工学研究室の松本謙一郎教授、ポリマーのさまざまな物性試験にご協力いただきました、国立研究開発法人理化学研究所の阿部英喜博士、論文作成や研究の進め方において、数多くのご指導、ご助言を頂きました、本学環境共生学部食健康科学科臨床病態代謝学研究室の外村彩夏助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数多くのご有益なご意見をいただきました、食品バイオ工学研究室元研究室助手の元村あかね氏、大学院博士前期課程修了の脇田和さん、倉富優季さん、森恵美さん、本学大学院博士前期課程在籍の西上明花さん、本学卒業の佐藤美咲さん、西村綾乃さん、中上美歩さん、留野菜月さん、龍野奈々美さん、福原愛恵さんに感謝申し上げます。そして、同研究室で共に研究に励んだ食品バイオ工学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

また、学部生から博士後期課程までお世話になった熊本県立大学の諸先生方、職員の皆様ならびに熊本県立大学大学院の皆様にも感謝申し上げます。最後に、陰ながら応援し、温かく見守り続けてくださいました友人および家族に心より感謝いたします。

この研究の一部は、平成 29 年度笹川科学研究助成（研究番号 29-641）を受けて実施されました。