

博士論文

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

**Molecular analysis of polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and
genetically engineered bacteria for production of practical 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

外村 彩夏

2014年度 (2015年3月)

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

目次

	頁
第一章 序論	5
1-1 合成高分子	6
1-2 生分解性プラスチック	6
1-3 ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)	11
1-4 <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3 が合成する PHA	15
1-5 PHA 顆粒の特徴と PHA 顆粒結合タンパク質	18
1-6 <i>Ralstonia eutropha</i> が合成する PHA	21
1-7 二酸化炭素からの PHA 生産	23
1-8 大腸菌を宿主とした共重合ポリエステルの合成	25
1-9 研究の目的	26
引用文献 (第一章)	29
第二章 <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3 のポリヒドロキシアルカン酸顆粒結合 タンパク質遺伝子のクローニングと顆粒結合タンパク質の局在性	38
2-1 緒言	39
2-2 実験操作	40
2-2-1 使用菌株および使用プラスミド	40
2-2-2 菌株の保存	40
2-2-3 GA24 遺伝子のクローニング	42
2-2-4 <i>phaCl_{ps}</i> 遺伝子破壊株 (<i>Pseudomonas</i> sp. C1-TnK) の作製	50
2-2-5 遺伝子組換え株の作製	51
2-2-6 顆粒結合タンパク質の単離	51

2-2-7	SDS-PAGE	52
2-2-8	ガスクロマトグラフィー (GC)	52
2-3	結果および考察	52
2-3-1	<i>phbP_{ps}</i> および <i>phbF_{ps}</i> 遺伝子のクローニングと同定	52
2-3-2	PHA のモノマー組成と PHA 顆粒結合タンパク質の局在性	58
2-4	小括	62
引用文献 (第二章)		64
第三章	<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3 のポリヒドロキシアルカ酸生合成遺伝子 クラスター上に存在する機能不明遺伝子	67
3-1	緒言	68
3-2	実験操作	68
3-2-1	使用菌株および使用プラスミド	68
3-2-2	機能不明 ORF の転写の確認	70
3-2-3	機能不明 ORF 導入株の作製	72
3-2-4	機能不明 ORF 破壊株の作製	73
3-2-5	機能不明 ORF の菌体内 PHA 分解酵素活性	75
3-3	結果および考察	76
3-4	小括	86
引用文献 (第三章)		88
第四章	組換え <i>Ralstonia eutropha</i> による PHA 生産	90
4-1	緒言	91
4-2	実験操作	91
4-2-1	使用菌株および使用プラスミド	91
4-2-2	組換えプラスミドの作製	93
4-2-3	<i>R. eutropha</i> H16 の <i>phbC_{re}</i> 遺伝子破壊株の作製	100
4-2-4	組換え株の作製	101

4-2-5	ポリエステルの性質と物性評価	102
4-3	結果および考察	103
4-4	小括	114
引用文献（第四章）		116
第五章	大腸菌を宿主とした糖からの生分解性共重合ポリエステルの 生合成～ (R)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子の クローニング～	118
5-1	緒言	119
5-2	実験操作	120
5-2-1	使用菌株および使用プラスミド	120
5-2-2	組換えプラスミドの作製	122
5-2-3	大腸菌組換え株の作製と PHA 生産	126
5-2-4	ポリエステルの性質と物性評価	127
5-3	結果および考察	128
5-3-1	大腸菌における P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの生合成	128
5-3-2	合成された P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの性質と特徴	133
5-4	小括	137
引用文献（第五章）		140
第六章	総括	142
引用文献（第六章）		147
Appendix		148
Appendix-1	使用培地	149
Appendix-2	protocols	153
謝辞		190

第一章

序論

1-1 合成高分子

今日、地球環境の悪化が深刻な問題となっている。特に、私たちの身近な問題である産業廃棄物および生活廃棄物の蓄積によってもたらされる環境問題は多くの関心を集めている。

プラスチックは合成樹脂を表す総称で、化石燃料由来の合成高分子材料の代表的なものである。軽くて強く、耐久性にすぐれ、透明性がよく、着色が容易で、水、ガス、電気を通さないなどの利点をもっていることから、プラスチックは私たちの生活に欠かせない合成高分子材料であるといえる。2013年度の日本におけるプラスチック原材料生産は年間約1058万トンに達し、その需要先は私たちの生活の中で多岐にわたっている^{1,2)}。しかしながら、近年では、大量に生産されたプラスチックは、用途が耐久消費財から使い捨て商品までの多方面にわたっているために、回収は事実上不可能であり、さまざまなりサイクル技術が開発されているものの、まだ多くはゴミとして排出されている。その結果、廃棄物処理能力の限界を迎える時代となった。プラスチックは、化学的にきわめて安定な化合物であり、丈夫で腐りにくい特徴を持っているが、反面、廃棄後、完全に分解されることがないために公害の元凶にもなっている^{3,5)}。地表に放置されたプラスチックは散乱ゴミとなり、野生動物を傷つける可能性がある。また、プラスチックが河川や海洋に流れ込み、海洋生物が誤って食し死に至る、漁業の障害になる、など深刻な海洋問題も引き起こしている。さらには、プラスチックをごみ処理場で焼却する際には、高温を発生して、焼却炉をいためたり、不適切な焼却方法によってはダイオキシンなどの有毒物質を発生することもある^{4,5)}。

そこで、近年、石油由来の合成高分子材料に代わる代替製品として、自然界に存在する微生物により分解される生分解性プラスチックが環境調和型プラスチックとして注目され、実用化に向けての開発が行われている。

1-2 生分解性プラスチック

前述のように、多くの合成高分子の廃棄物は、自然環境中で分解されないために、さまざまな環境問題を引き起こしている。そこで、自然との調和を考慮した環境にやさしい易分解性の高分子を生産する産業体系に変換していく必要があり、生分解性プラスチックが

環境調和型プラスチックとして期待されている。

生分解性プラスチックとは、使用中は通常のプラスチックと同様に使用でき、使用後は自然環境中に存在する微生物によって、水と二酸化炭素にまで分解され、自然界の炭素循環サイクルに組み込まれるものである (Figs. 1-1 and 1-2) ^{6,8)}。生分解性プラスチックの分解は以下のように起こる。まず、微生物が菌体外に分解酵素を分泌し、その菌体外分解酵素が材料表面に結合し、表面の高分子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。次に、分解生成物は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、好気的環境下で二酸化炭素に変換される。このような働きを持つ分解微生物は、海水、湖水、土中など自然環境中に広く分布している ^{6,9)}。

生分解性プラスチックの大きな特徴として、従来のプラスチックと同様に、マテリアルリサイクルやケミカルリサイクルも可能であるが、バイオリサイクル (メタンガス化、コンポスト化=堆肥化) が可能である点があげられる ^{7,10)}。特に、食品包装分野においては、夾雑物除去に手間がかかるため、バイオリサイクル内での処理が最も効果的な用途といえる。2005年に開催された2005年日本国際博覧会 (愛称; 愛・地球博) においても、フードコート内での食器やゴミ袋に生分解性プラスチックが導入され、使用後は生ゴミと一緒にコンポスト化し、農地へ還元された ^{10,11)}。

環境調和型プラスチックとして期待される、この生分解性プラスチックはグリーンプラという愛称で呼ばれている。これは、単なる愛称ではなく、国際的に合意された標準化試験法によって測定し、生分解度の合格基準や、重金属などの含有物と分解中間産物の安全性の基準をクリアした生分解性プラスチックだけが“グリーンプラ”のロゴとマークを使用することができる (Fig. 1-3) ^{7,10)}。また、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、バイオマスプラスチック製品を「バイオマスプラ」として認定し、シンボルマークの使用を許可する制度も発足している (Fig. 1-3) ¹⁰⁾。生分解性プラスチックは、自然環境中で分解されることから、自然界で使用される分野、回収やリサイクルが難しい分野、そのための費用やエネルギーが大きな分野で利用が期待されている (Table 1-1) ^{4,7,10)}。

代表的な生分解性プラスチックを Table 1-2 に示す。この中で、化学合成系脂肪族ポリエステルには、化石燃料由来のものと植物由来のものがあるが、環境配慮型のプラスチックの場合、石油系ではなく植物系の素材を活用するバイオマスプラスチックが望ましい。

現在、研究の盛んなバイオマスプラスチックはポリ乳酸（PLA）である。アメリカのカーギル・ダウ社は、トウモロコシ畑に巨大なポリ乳酸生産プラントを建設し、国内外の企業に提供を求めている。国内では、トヨタがサツマイモデンプンからポリ乳酸を製造するプラントを建設し、車体の一部として使用することに成功し、富士通がノートパソコンの一部に使用したり、ソニーがウォークマンの一部に使用するなど、日本においてもポリ乳酸の汎用プラスチックとしての利用が進んでいる。しかしながら、ポリ乳酸の食料需給への影響や加水分解と微生物分解の二段階分解のために分解が遅いこと、3ステップ生産のために手間がかかること等の課題も抱えている^{7,12-14)}。

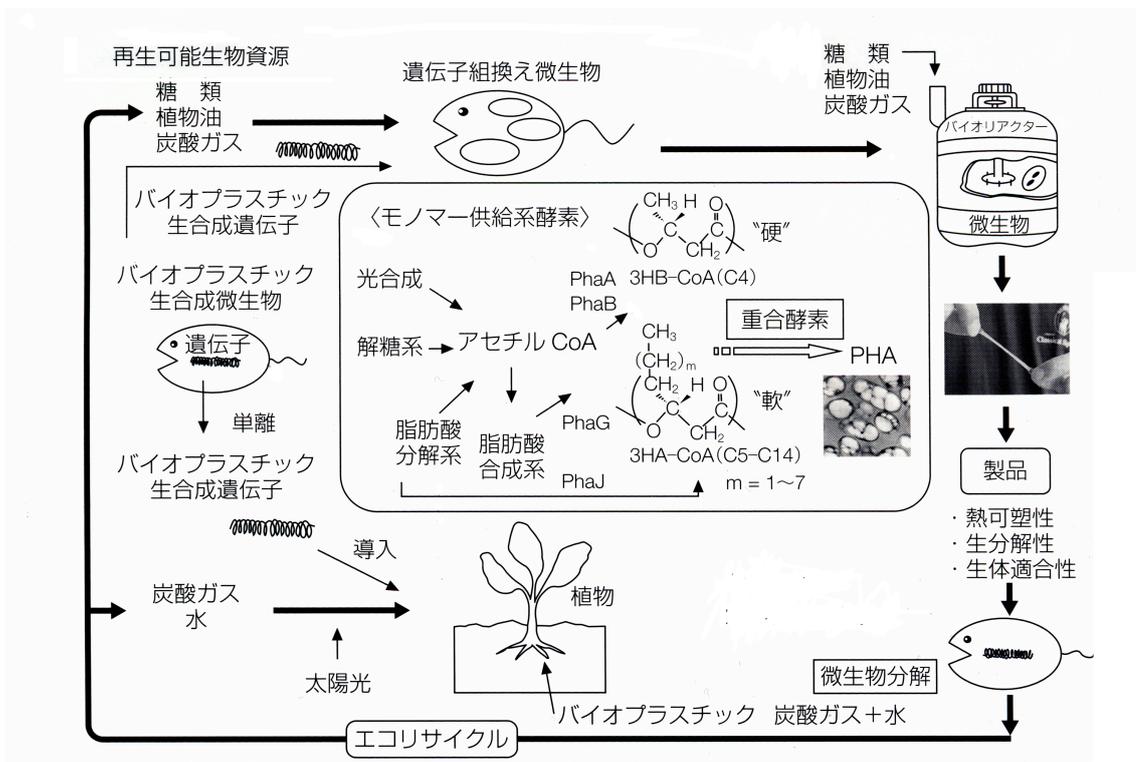


Fig. 1-1 生分解性プラスチックの生産と分解サイクル⁸⁾

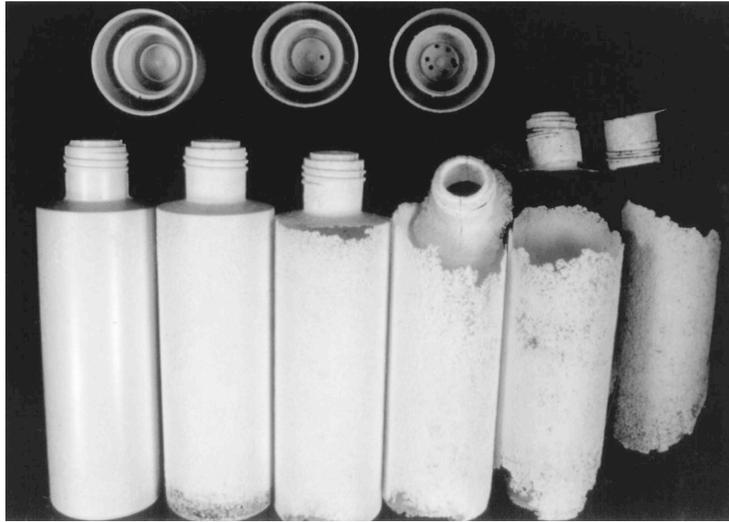


Fig. 1-2 生分解性プラスチックが分解される様子⁶⁾



Fig. 1-3 グリーンプラおよびバイオマスプラのロゴ¹⁰⁾

Table 1-1 生分解性プラスチックの用途例^{4,7,10)}

1) 農林水産業用資材
マルチフィルム、移植用苗ポット、釣り糸、漁網など
2) 土木建築資材
荒地・砂漠の緑化・工事用などの保水シート、 山間・海中などの回収困難な土木工事の型枠など
3) 野外レジャー製品
釣り用品、登山用品など
4) 食品包材
生鮮食品用のトレー、インスタント食品・ファーストフードの容器、 弁当箱など
5) 衛生用品
紙おむつ、生理用品など
6) 日用雑貨
ゴミ袋、コップ、歯ブラシ、ケースなど
7) 生体機能材料
手術用縫合糸、骨片接合用スクリューなど

Table 1-2 生分解性プラスチックの主な種類^{4,7,10)}

1) 微生物系
・バイオポリエステル (P(3HB)など)
・バクテリアセルロース
・微生物多糖
2) 化学合成系
・脂肪族ポリエステル (ポリカプロラクトン, ポリブチレンサクシネート, ポリ乳酸など)
・ポリビニルアルコール
・ポリアミノ酸類
3) 天然系
・キトサン/セルロースでんぷん
・酢酸セルロース
4) 複合物系
・デンプン/脂肪族ポリエステル
・デンプン/ポリビニルアルコール

1-3 ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)

多くの微生物は、エネルギー貯蔵物質として菌体内に生分解性高分子の一種であるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を合成・蓄積する。1926 年にフランスの Lemoigne¹⁵⁾ により、*Bacillus megaterium* からポリ ((R)-3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB)) が発見され、1960 年代から 1970 年代に Merrick と Doudoroff¹⁶⁾ によって熱可塑性を有し、合成プラスチック原料と同様に利用が可能であることが明らかにされた。現在までに 200 種類以上の微生物が、ある種の栄養源 (窒素源やリン源) 欠乏条件下にて多様な炭素源からさまざまなモノマー組成からなる PHA を合成・蓄積することが知られている¹⁷⁾。そして、外部からの炭素供給が不足すると分解して生命活動のエネルギー源とする。すなわち、植物や動物におけるデンプンや脂肪と同じ役割を有する、微生物にとっての有機炭素の貯蔵物質である。

1974 年、米国農務省研究所の Wallen と Rohwedder は活性汚泥から共重合ポリエステルを発見し、これを契機にさまざまな自然環境から共重合ポリエステルが検出され、自然界の微生物が共重合ポリエステルを合成していることが示された^{18,19)}。また、1981 年、イギリスでは、ICI 社が水素細菌 *Ralstonia eutropha* (旧名 *Alcaligenes eutrophus*) を宿主として、炭素源にグルコースとプロピオン酸を与えることで、3HB と (R)-3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) とのランダム共重合体 P(3HB-co-3HV) を合成することに成功し、これは、かつて“Biopol”の商標で市販されていたが、現在では、Biopol の事業権はアメリカの Metabolic 社に継承されている^{10, 19, 20)}。その後、土肥らは、水素細菌を宿主として、炭素源として与えるブタン酸とペンタン酸の比を変えることによって、3HV の分率が 0~95 mol% の広い組成範囲のランダム共重合体を合成できると報告した²¹⁾。

PHA は優れた生分解性があり、好気、嫌気、コンポストいずれの条件下でも分解することがわかっている。また、PHA のようなバイオポリエステルは 180°C 前後で融ける性質をもっており熱可塑性のプラスチックである。このように「融ける」という性質をもつ天然高分子は、バイオポリエステルの他にはなく、押出、射出、ブロー、紡糸などの多様な成形により、食品包装容器、衛生用品、農林水産用資材、繊維、紙製品のコーティング材などの多くの用途への使用が期待されている^{10, 22)}。

PHA 生産菌は、そのポリエステルを構成するモノマーユニットの構造により、大きく 2 つに分類される (Fig. 1-4)²⁰⁾。グループ 1 は、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) からなるポリエステル (scl-PHA) を合成するもの

で、モノマーユニットを構成する主成分は3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) ユニットである。代表的なものにポリ-(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸 (P(3HB)) を合成する *Ralstonia eutropha* があげられる。グループ2は、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ポリエステル (mcl-PHA) を合成するもので、主なモノマーユニット構成成分は、(*R*)-3-ヒドロキシオクタン酸 (3HO) と(*R*)-3-ヒドロキシデカン酸 (3HD) である。これらのモノマーユニットの組成はその菌が有する PHA 重合酵素とモノマーユニット供給系酵素の基質特異性に支配される。rRNA ホモロジーグループ I に属する *Pseudomonas* 属細菌の多くは、グループ2に分類される。

P(3HB)の生合成経路は、 β -ケトチオラーゼ (PhbA)、NADPH 依存性アセトアセチル CoA リダクターゼ (PhbB)、PHB 重合酵素 (PhbC) の3つの酵素反応からなる (Fig. 1-5)。まず、2分子のアセチル CoA が PhbA の作用により縮合し、アセトアセチル CoA となる。次に、PhbB の作用で、(*R*)-3-ヒドロキシブチリル CoA ((*R*)-3HB-CoA) へと還元され、最後に、PhbC により重合され、P(3HB)が合成される。これら3つの酵素遺伝子は、*R. eutropha* では *phbCAB* オペロンを形成している²⁰⁾。

β -ケトチオラーゼは、それらの基質特異性によって2つのグループに分けられる。1つ目のグループは、炭素数4~16の3-ケトアシル CoA に広く基質特異性を示すもので、主に β 酸化に関与している。もう1つのグループは、炭素数3~5の β -ケトアシル CoA にのみ活性を示すものである。*R. eutropha* は、PhbA 以外に少なくとも2つの β -ケトチオラーゼ (BktB および BktC) を有していることが知られている^{6,20)}。

一方、mcl-PHA は、*de novo* 脂肪酸合成あるいは β 酸化を経て合成される。脂肪酸を炭素源とした場合、 β 酸化を経由し、中間代謝産物 (*S*)-3-ヒドロキシアシル CoA ((*S*)-3HA-CoA) が生成されるが、PHA 重合酵素 (中鎖長特異的 PHA 重合酵素) は(*R*)体の3-ヒドロキシアシル CoA ((*R*)-3HA-CoA) を基質とするため、(*S*)-3HA-CoA は基質となり得ない。そこで、 β 酸化を経て(*R*)-3HA-CoA が生成される分岐経路として、(*R*)体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ (PhaJ)、エピメラーゼ、3-ケトアシル CoA リダクターゼの3経路が考えられるが、完全な解明には至っていない^{20,23,24)}。*Aeromonas caviae* では、脂肪酸 β 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 (PhaJ) によって(*R*)-3HA-CoA が供給される^{23, 25, 26)}。また、*Pseudomonas* 属細菌でも *phaJ* 遺伝子が発見されており、(*R*)体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ (PhaJ) が有力なモノマー供給系酵素であると考えられる^{20,27,28)}。*R. eutropha* においても、ゲノム情報から、*A. caviae* や *P. aeruginosa* の(*R*)体特

異のエノイル CoA ヒドラーターゼ遺伝子 (*phaJ*_{Ac}, *phaJ1*_{Pa}, *phaJ2*_{Pa}, *phaJ3*_{Pa}, *phaJ4*_{Pa}) のホモログが見いだされており、特に、*R. eutropha* の *phaJ4a*_{Re}, *phaJ4b*_{Re} および *phaJ4c*_{Re} 遺伝子を導入した組換え株による共重合 PHA の合成が報告されている²⁹⁾。

糖を炭素源とした場合、生成したアセチル 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 がアシルキャリアータンパク質 (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。このようにして生成された (*R*)-3HA-CoA は、PHA 重合酵素によって重合され、P(3HA)が合成される。このグループの微生物が持つ PHA 重合酵素は、幅広い基質特異性を有し、炭素数 6~14 までの (*R*)-3HA-CoA に活性を示す (Fig. 1-5)^{20,30-32)}。

微生物菌体内に蓄積した PHA は菌体を酵素リゾチームや次亜塩素酸で処理すると、細胞壁が溶解するために、顆粒として取り出すことができる。また、クロロホルム抽出法によっても、微生物菌体内から高純度で PHA を取り出すことが可能であり、水酸化ナトリウムやエタノールを用いた PHA 抽出も報告されている^{22,33,34)}。このようにして、取り出された PHA は自然環境中に存在する微生物が分泌する酵素によって完全に分解されるため、環境に負荷を与えない高分子材料として注目され、実用化に向けての開発が進んでいる。また、PHA は微量ながら人の生体内にも存在し、生体適合性を有するため、生体機能材料 (バイオマテリアル) としても注目され、生物・医学領域への展開も期待されている²⁰⁾。

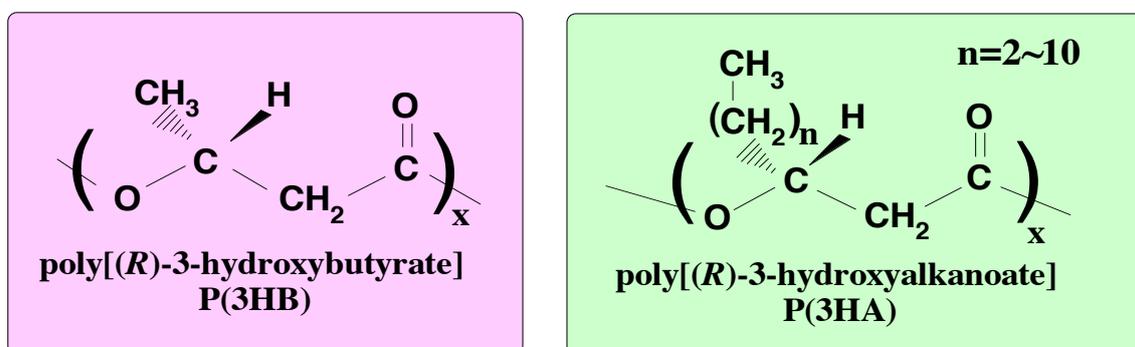
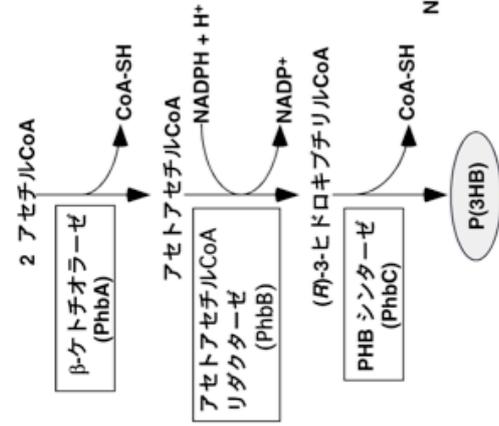


Fig. 1-4 P(3HB)とP(3HA)の構造式

R. eutropha



Pseudomonas 属

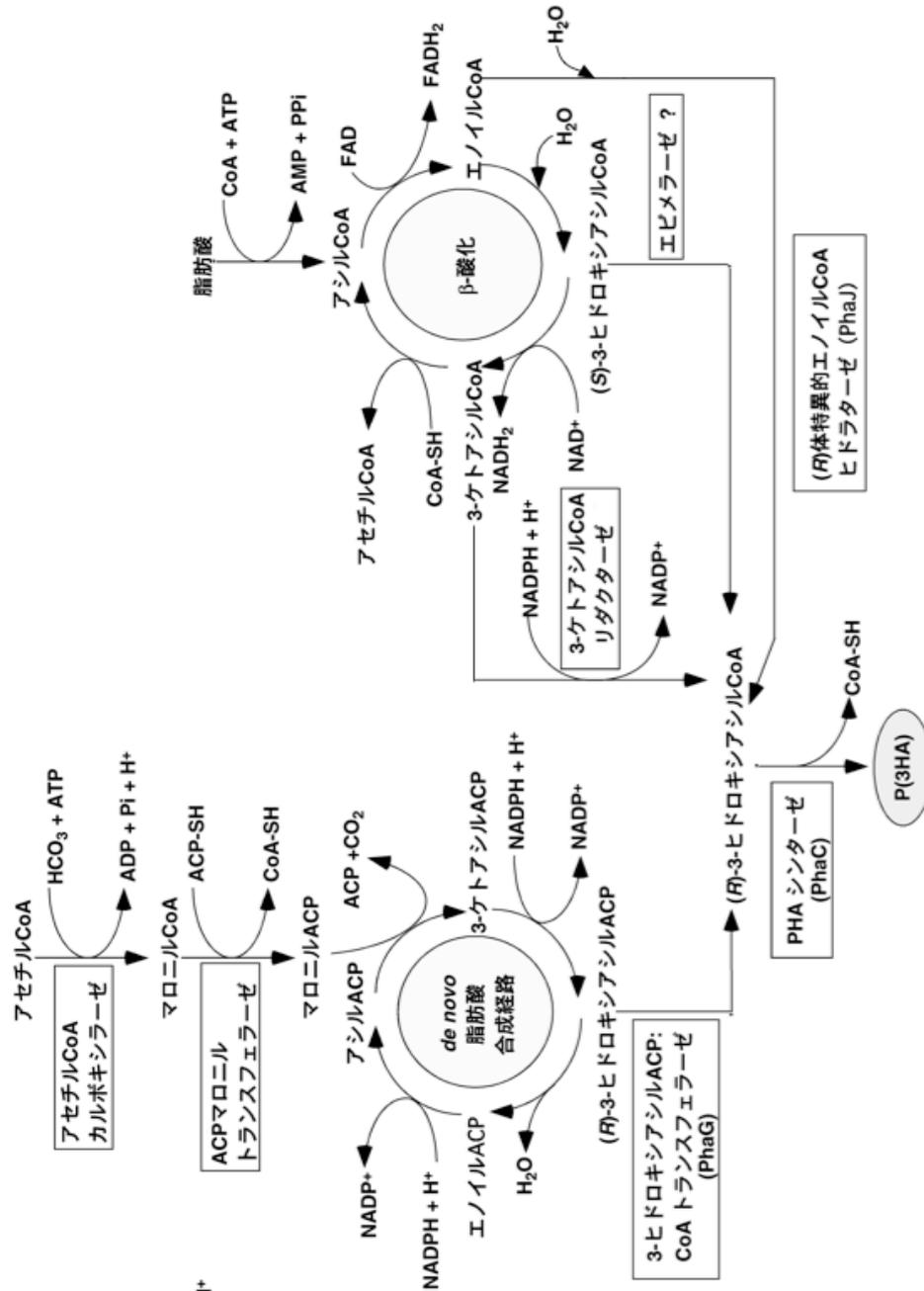


Fig. 1-5 P(3HB)とP(3HA)の生成経路

1-4 *Pseudomonas* sp. 61-3 が合成する PHA

Pseudomonas 属細菌は、グラム陰性菌であり、好気性化学合成従属栄養細菌である。1983年、*P. olevorans* がオクタンを炭素源として P(3HA)を蓄積することが報告された³⁵⁾。*P. olevorans* は脂肪酸や炭化水素を炭素源とすると P(3HA)を蓄積するが、糖を炭素源とした場合は PHA を合成しない。これは、*P. olevorans* では *phaG* 遺伝子のプロモーターが欠損していることによる³¹⁾。一方、*P. putida* や *P. aeruginosa* は、糖を炭素源とした場合でも P(3HA)を合成する。*Pseudomonas* 属細菌の *pha* locus には、2 つの PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1* および *phaC2*)、細胞内 PHA 分解酵素遺伝子 (*phaZ*)、機能不明の遺伝子 (*phaD*) が存在している³⁶⁾。

2 つの PHA 重合酵素遺伝子 *phaC1* および *phaC2* は、アミノ酸レベルで高い相同性を示すものの、同じ locus 上にこの 2 つの PHA 重合酵素遺伝子が存在する理由についてはさまざまな議論がなされているが、明確でない。これまでに、2 つの重合酵素の基質特異性について、ほとんど同じ傾向を示すと報告したのは *P. aeruginosa* と *Pseudomonas* sp. 61-3 のみであり³⁶⁻³⁸⁾、近年では、2 つの違いが報告されている例が多い^{39,40)}。*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る。一方、PhaC2 については、*phaC2* 遺伝子と *phaD* 遺伝子を挿入したプラスミド、および *phaC2* 遺伝子と *R. eutropha* 由来の *phbAB* 遺伝子を挿入したプラスミドを、*R. eutropha* の PHA 合成能欠損株および *Pseudomonas* sp. 61-3 の *phbC* 遺伝子破壊株に導入したところ (湯之上, 未発表)、PhaC1 と同様に炭素数 4~12 のモノマーを取り込むことができることが明らかとなっている³⁸⁾。また、*Pseudomonas* sp. 61-3 では、*phaC1* と *phaC2* は 1 つの転写産物として、あるいは別々の転写産物として転写されていることが示唆され (佐志, 未発表)、PhaC1 タンパク質が主要な PHA 重合酵素として機能しており、PhaC2 タンパク質はその補足的な役割を担っていると予想されている⁴¹⁾。

Pseudomonas sp. 61-3 は、他の *Pseudomonas* 属細菌とは異なり、糖や脂肪酸を炭素源として、炭素数 4 の 3HB モノマーユニットからなる P(3HB)ホモポリマーと、炭素数 4~12 の 3HA モノマーユニットからなるランダム共重合ポリエステル P(3HB-co-3HA)の 2 種類の PHA を菌体内に合成・蓄積する珍しい細菌である⁴²⁻⁴⁵⁾。本菌は、窒素制限下で P(3HB)ホモポリマーを合成し、窒素が完全に枯渇した条件下で P(3HB)と P(3HB-co-3HA)の 2 種類のポリエステルを合成する (Fig. 1-6)^{43,45)}。これまでに、PHA 生合成に関与する遺伝子は、P(3HB)

の合成に關与する *phb* locus と P(3HB-co-3HA)の合成に關与する *pha* locus がそれぞれ同定されている (Fig. 1-7)^{38,41)}。また、*Pseudomonas* sp. 61-3 における糖類や脂肪酸からのポリエステル生合成経路を Fig. 1-8 に示す。

鎖長の短い炭素数4の3HBが重合した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3HAが重合したP(3HA)はアルモ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ならない⁴⁰⁾。しかしながら、3HBユニットと炭素鎖長の長い3HAユニットとのランダム共重合ポリエステルは、その組成に応じて、丈夫でしなやかな実用的なポリエステルの物性を示すと考えられた。そこで、*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHB 重合酵素遺伝子 (*phbC*) を破壊し、P(3HB)合成能を欠損させ、P(3HB-co-3HA)のみを合成する *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)が作製されたが、合成されたP(3HB-co-3HA)は、3HB分率が15~27%と低かった³⁸⁾。そこで、松崎らは、3HB分率を高め、PHAの強度を高めるために、*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1*)、*R. eutropha* 由来のβ-ケトチオラーゼ遺伝子 (*phbA*)、アセチル CoA リダクターゼ遺伝子 (*phbB*) の3つを導入した遺伝子組換え株をいくつか作製したところ、3HB分率の高いP(3HB-co-3HA)の合成に成功した^{47, 48)}。特に、*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJKSc54-*phab* 株が合成したP(94% 3HB-co-3HA)は、低密度ポリエチレン (LDPE) と似た物性を示す⁴⁷⁾。

前述のように、*Pseudomonas* sp. 61-3 には、PHA 合成に關する遺伝子群が2つ存在している³⁸⁾。*pha* locus は、他の *Pseudomonas* 属細菌の *pha* locus と非常に相同性が高く、同様の遺伝子が存在する。一方、*phb* locus は、P(3HB)合成のために必要な酵素 PhbB、PhbA、PhbC タンパク質の遺伝子が、*phbBAC* オペロンとして存在する。さらに、この *phbBAC* オペロンと逆向きに、推定転写調節遺伝子 *phbR* が存在している (Fig. 1-7)³⁸⁾。これまでの研究で、β-ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) を用いたレポーターアッセイを行った結果、*phbR* 遺伝子導入株において、*phbBAC* オペロンのプロモーター活性が高くなることから、PhbR は *phbBAC* オペロンの転写アクチベーターとして働くことが予想されている³⁸⁾。また、*Pseudomonas* sp. 61-3 の *phbR* 遺伝子破壊株を、脂肪酸を炭素源として培養したところ、野生株と比較して3HB分率の低いPHAが合成された (佐志, 未発表)。加えて、LB 培地でグルコースを炭素源とした場合、野生株においては、P(3HB)ホモポリマーと3HB分率の高いP(3HB-co-3HA)を合成するのに対して、*phbR* 遺伝子破壊株では、*phbBAC* 遺伝子が転写されないために、P(3HB)が合成されず、PHA蓄積率も低下する。また、MS 培地でグルコースを炭素源とした場合、野生株に比べて *phbR* 遺伝子破壊株では、合成された

P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの3HB分率が低下する。このことから、*Pseudomonas* sp. 61-3において、3HBユニットの主な供給源であり、P(3HB)の合成に関わる *phbBAC* オペロンの転写に *phbR* 遺伝子が必須であることがわかる³⁸⁾。

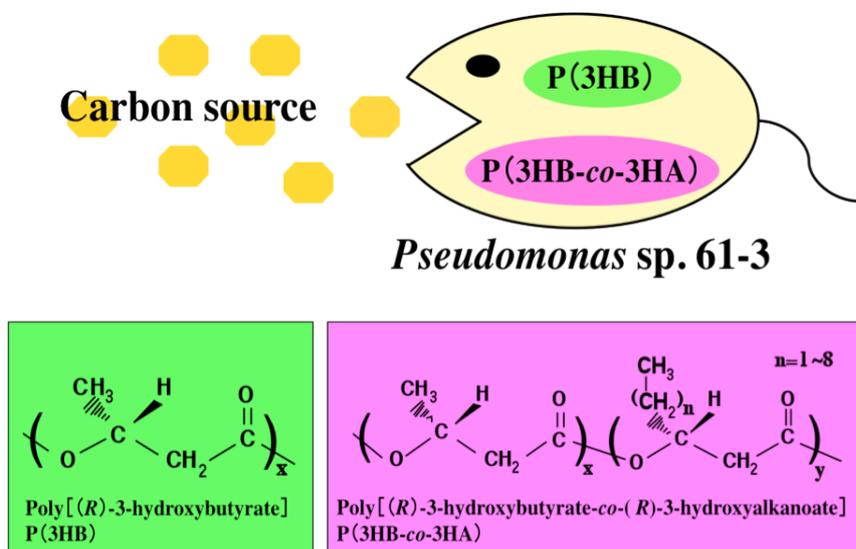


Fig. 1-6 *Pseudomonas* sp. 61-3 が菌体内に蓄積するポリエステル

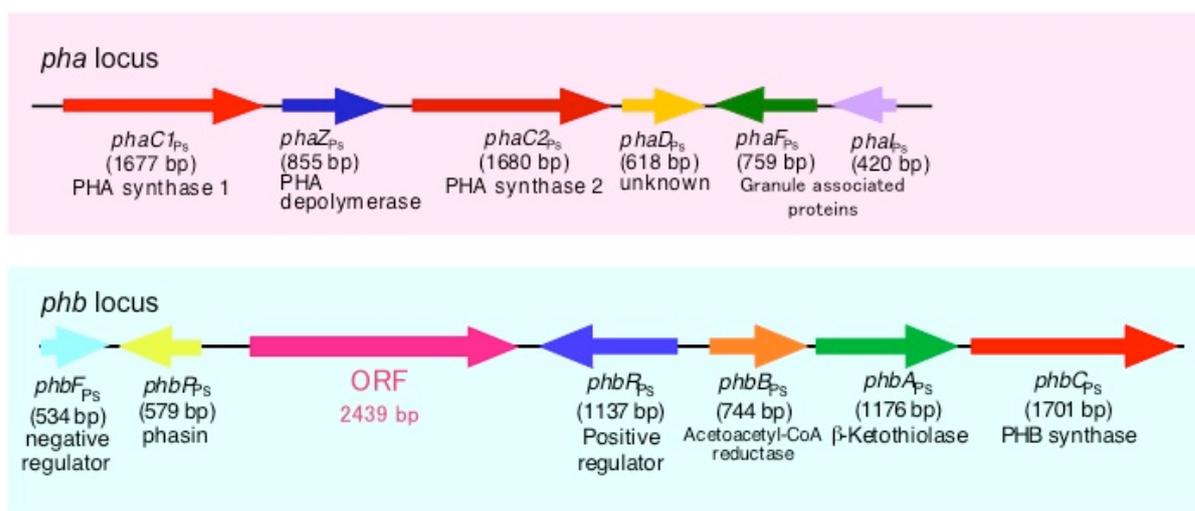


Fig. 1-7 *Pseudomonas* sp. 61-3 のポリエステル生合成遺伝子クラスター

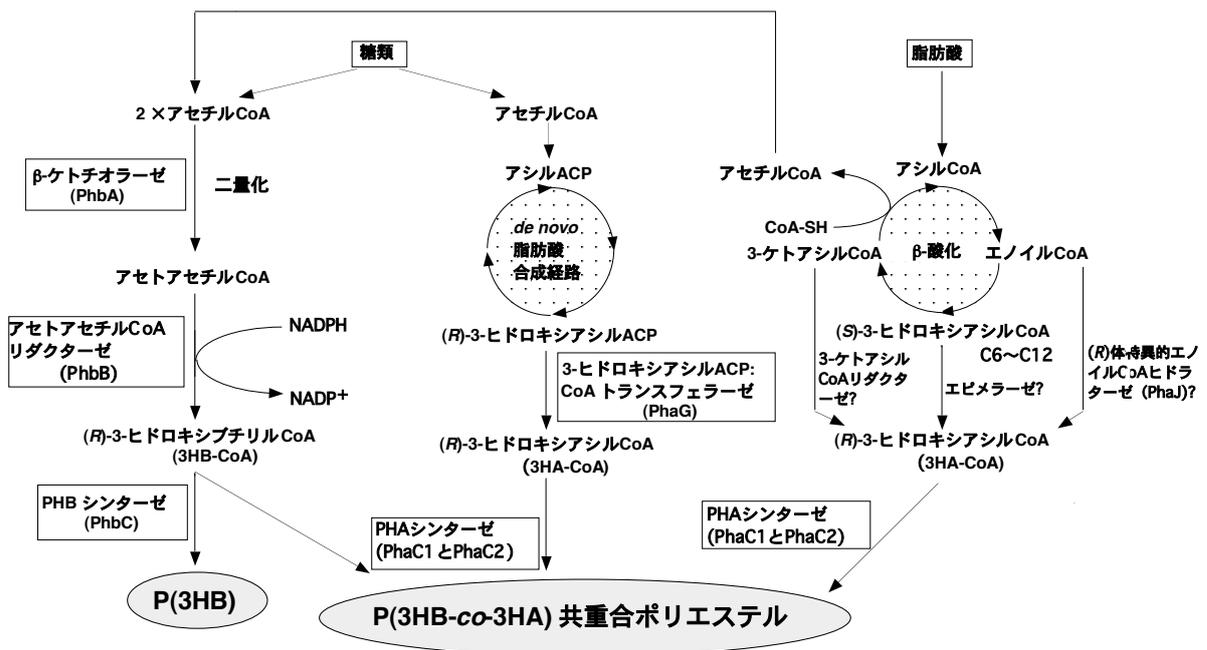


Fig. 1-8 *Pseudomonas* sp. 61-3 におけるポリエステル合成経路

1-5 PHA 顆粒の特徴と PHA 顆粒結合タンパク質

PHA は、その合成や制御に関わるタンパク質や脂質を含む顆粒として菌体内に蓄積される⁴⁹⁾。*R. eutropha* では、1つの細胞に8~12個のPHA顆粒が存在し、その直径は、0.2~0.5 μm である⁵⁰⁻⁵³⁾。¹³C-NMR や X-ray diffraction、電子顕微鏡を用いた解析により、PHA は菌体内でアモルファスの状態で存在していることが明らかになっており^{51, 53, 54)}、PHA を蓄積した微生物の凍結切断レプリカを作製し、透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した結果、P(3HB)顆粒は針状に、P(3HA)顆粒はマッシュルーム状の形態で観察されることも報告されている^{35, 45, 55)}。PHA 顆粒表面には、膜構造が存在すると考えられており、その形成機構を明らかにするために多くの研究がされてきた^{49, 51, 53, 54, 56, 57)}。その膜構造のモデルとして以下の3つが考えられる。まず1つ目に、PHA 重合酵素や菌体内分解酵素などのタンパク質が埋め込まれたリン脂質の膜が存在するというモデル^{49, 56)}、次に、リン脂質単層に顆粒結合タンパク質が存在するというモデル⁵⁷⁾、そして最後に、リン脂質二重膜をもつ多くの膜構造が存在し、そこに顆粒結合タンパク質が存在するというモデルである^{57, 58)}。しかしながら、構造を決定付ける強力な証拠はなく、現在も議論が続いており、*Pseudomonas* sp. 61-3 においても PHA 顆粒の膜構造については明らかとされていない。

PHA の形成機構については、少しずつ明らかになってきている。Gerngross らは、*R. eutropha* の PHB 重合酵素の抗体を用いた免疫細胞化学的手法により、顆粒表面における PHB 重合酵素の局在性について検討した⁵⁹⁾。その結果、PHB 重合酵素は、PHA 非合成時には菌体内に分散しているが、PHA が顆粒として蓄積され始めると PHB 重合酵素はポリエステル顆粒の表面に局在することが明らかになった。このことは、PHB 重合酵素が PHA の重合反応を行いながら、顆粒の形成に作用することを示唆している。

PHA 顆粒表面には、顆粒と特異的に結合する顆粒結合タンパク質 (GAP; granule-associated protein) が存在する⁵⁹⁾。これまでに、*R. eutropha* や *Pseudomonas* などの PHA 生産菌から GAP が単離され、それらのタンパク質をコードする遺伝子もクローニングされている。GAP は、(1) PHA 重合酵素、(2) PHA 分解酵素、(3) phasin、(4) その他、に分類される。phasin は、両親媒性のタンパク質で、PHA 生合成に関わっていることや phasin のコピー数が PHA 顆粒サイズに影響することが知られている⁶⁰⁻⁶²⁾。*R. eutropha* において、phasin の構造遺伝子 *phaP* (*phaP1*) が同定されており、PhaP (PhaP1) を過剰に発現させると、P(3HB)顆粒の大きさが小さくなることが報告されている⁶⁰⁾。さらには、*Rhodococcus ruber*⁵⁶⁾, *Acinetobacter* sp.⁶³⁾, *Chromatium vinosum*⁶⁴⁾, *Bacillus megaterium*⁶⁵⁾ および *Paracoccus denitrificans*⁶⁶⁾ においても、*phaP* 遺伝子が同定されている。また、*P. denitrificans* 由来の *phaR* 遺伝子が PHB 顆粒から単離され、*phaP* 遺伝子の発現を抑制すると予想されている⁶⁶⁾。また、*P. olearans* においては、PhaF が PHA 顆粒と DNA の両方に結合する性質を有しており、PHA 顆粒非存在時には PHA 生合成遺伝子のプロモーター領域に結合して、PHA 生合成系遺伝子の発現を抑制している。そして、PHA 顆粒が蓄積されると、PhaF や PhaI は PHA 顆粒と結合し、そのことによって前述の抑制が解除されて PHA 合成系遺伝子の発現が活性化される (Fig. 1-9)⁶⁷⁾。上述のように、GAP は、PHA 顆粒の安定性に関わるだけでなく、PHA 生合成遺伝子の転写調節に関与しているものや PHA 重合酵素の活性を高めるものも知られており⁶⁸⁾、GAP の詳細な機能解析が必要である。

Pseudomonas sp. 61-3 においても、合成する 2 種類の PHA、P(3HB)と P(3HB-co-3HA)のそれぞれの顆粒に特異的に結合する GAP が存在する (Fig. 1-10)⁴¹⁾。P(3HB)顆粒には、分子量 24 kDa のタンパク質 (GA24) と分子量 48 kDa のタンパク質 (GA48) が主に特異的に結合し、P(3HB-co-3HA)顆粒には、分子量 18 kDa のタンパク質 (GA18) と 36 kDa のタンパク質 (GA36) が特異的に結合する。それぞれの N 末端アミノ酸配列を Table 1-3 に示す。GA18 および GA36 については、それぞれ PhaI および PhaF として同定され、それら

の遺伝子は *pha* クラスター上に存在する⁴⁾。GA48 は、膜結合型タンパク質 (porin) が非特異的に結合していると考えられているが、GA24 に関しては同定されていない。また、これらの GAP の局在性が何に起因して PHA 顆粒に結合するかについても、明らかとなっておらず、その要因として、PHA のモノマー組成を認識するものと PHA 重合酵素との相互作用が考えられるが、いまだ解明されていない。

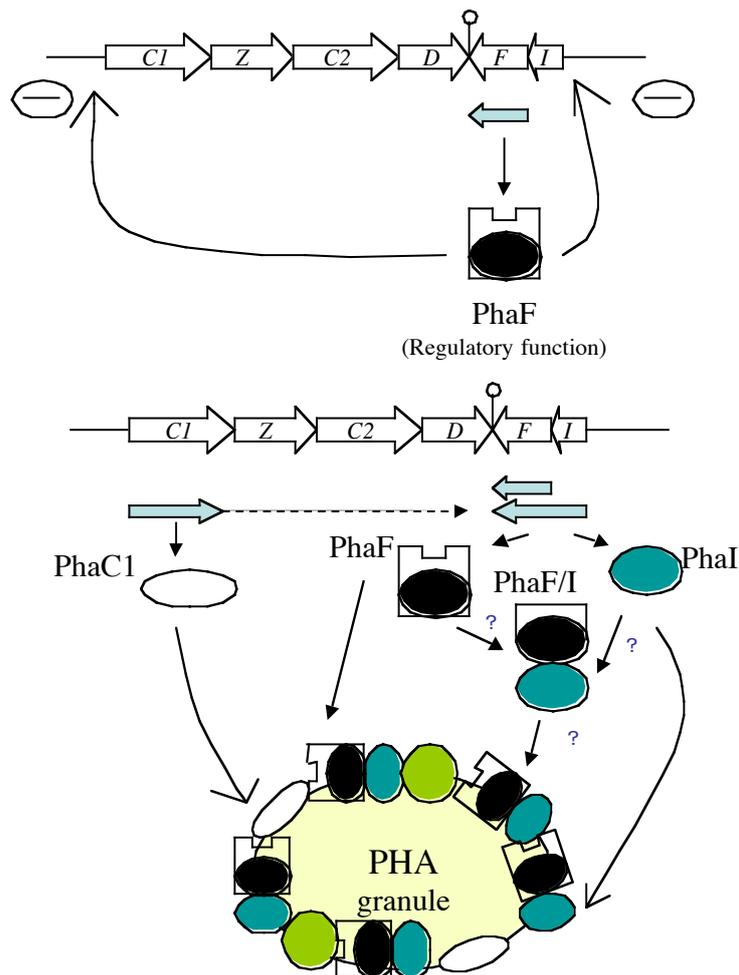


Fig. 1-9 *P. olearans* における *pha* 遺伝子群の制御モデル⁶⁾

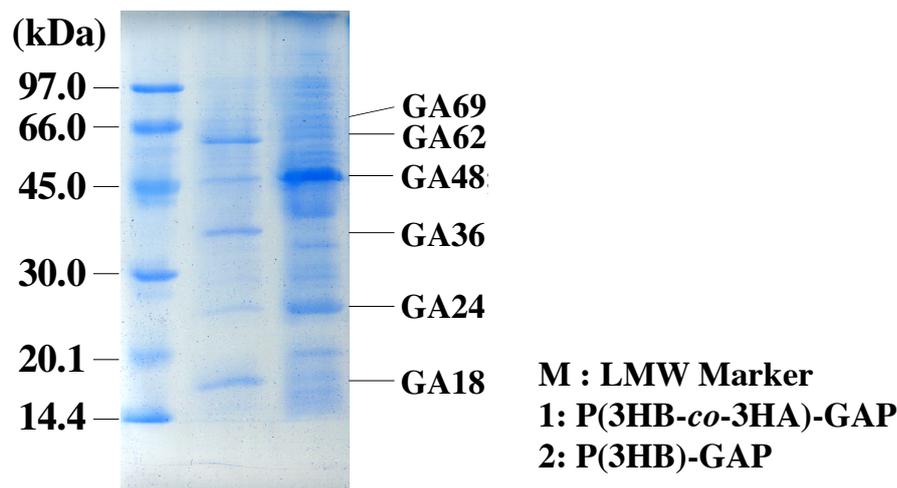


Fig. 1-10 *Pseudomonas* sp. 61-3 の 2 種類の PHA 顆粒に結合する GAP の SDS-PAGE

Table 1-3 N 末端アミノ酸配列

GA18 : NH₂-AKVSLKKEIDVQPTTLSEVKVTAXKIXLAG · · · (PhaI_{Ps})

GA36 : NH₂-AGKKNTEKEGSSXIGKV · · · (PhaF_{Ps})

GA24 : NH₂-(M)TFFNLEKLQDAQKANLDDLQIQISGKIFASVEQLT · · ·

1-6 *Ralstonia eutropha* が合成する PHA

Ralstonia eutropha は、グラム陰性菌であり、化学合成独立栄養細菌の一種である。増殖が速く、PHA 蓄積能が非常に高いため、現在広く研究されている。*R. eutropha* は糖や二酸化炭素を炭素源とした場合、P(3HB)を合成する。P(3HB)の生合成経路は、本章 1-3 で述べたように、β-ケトチオラーゼ (PhbA)、NADPH 依存性アセトアセチル CoA リダクターゼ (PhbB)、PHB 重合酵素 (PhbC) の 3 つの酵素反応からなり、これら 3 つの酵素遺伝子は、*R. eutropha* においては *phbCAB* オペロンを形成している²⁰⁾。このように、*R. eutropha* の *phbCAB* オペロンにはタイプ I の PHA 重合酵素遺伝子 (*phbC*) と二量化系酵素遺伝子 (*phbAB*) が存在しており、*phbCAB* オペロンの約 4.6 kb 下流には、PhbA よりも幅広い基質特異性を有するβ-ケトチオラーゼ遺伝子 (*bktB*) が存在する。この *bktB* 遺伝子は、炭素数 5 の 3HV ユニットを含む共重合ポリエステル、P(3HB-co-3HV)の効率的合成に重要な役割を担っている^{20,69)}。また、本菌の PhbC は短鎖長の 3-ヒドロキシアシル CoA、特に、(R)-3-

ヒドロキシブチリル CoA (3HB-CoA) に特異的である。優れた物性を有する PHA を微生物によって発酵合成するためには、その分子構造や組成を自由にコントロールすることが重要である。*R. eutropha* を宿主として、脂肪酸を炭素源として培養すると、共重合体が合成されるが、糖や二酸化炭素を炭素源として培養すると、P(3HB)ホモポリマーのみが合成される。この P(3HB)は非常に規則正しい分子構造をもつために、結晶性が高く、その結果、硬くて脆い性質を有し、実用性に乏しい材料である。そこで、さまざまな炭素源を用いることで、*R. eutropha* で P(3HB-co-3HV)や P(3HB-co-4HB) (4HB, 4-ヒドロキシブタン酸 (C₄)) の生合成が行われてきた^{21, 22)}。また、*A. caviae* の PHA 重合酵素遺伝子を導入した組換え *R. eutropha* で、脂肪酸から乾燥菌体重量あたり約 80~90 wt% の P(3HB-co-3HHx) (3HHx, 3-ヒドロキシヘキサン酸 (C₆)) を合成させることに成功している⁷⁰⁾。さらには、*Pseudomonas* sp. 61-3 の幅広い基質を利用できる PHA 重合酵素遺伝子 (*phaCI*) と *R. eutropha* の *phbAB* 遺伝子を導入した組換え *R. eutropha* で、植物油から炭素数 4~12 の 3HA ユニットからなり、3HB 分率が高い、新しいモノマー組成比からなる共重合ポリエステル、P(3HB-co-3HA) の合成にも成功している^{20, 48)}。このようなモノマー組成のポリエステルは、丈夫な高分子材料として期待される。

これまでの研究で、物性の優れた共重合体を取得するために、低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子である *Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaCI* を *R. eutropha* PHB4 に導入した組換え株を作製し、糖を炭素源として培養したが、P(3HB)ホモポリマーしか合成されなかった⁴⁸⁾。これは、*R. eutropha* がβ酸化からの 3HA ユニット供給経路を有しているが、脂肪酸合成経路からの 3HA ユニット供給経路を有していないことが原因であると考えられた。また、*R. eutropha* は、化学合成独立栄養細菌であるので、二酸化炭素を唯一の炭素源として物性の優れた PHA が合成できれば、高度環境調和型の PHA 生産システムを構築できるといえる。このように環境問題にも大きく貢献することができるため、大いに注目される宿主といえる。

このように、遺伝子組換え技術を応用することによってポリエステルの生産量を向上させたり、優れた物性の共重合ポリエステルを生合成できるようになってきた。

また、近年では、*R. eutropha* の PHB 生合成遺伝子を利用し、実用的な PHA を合成する研究も行われている。例えば、*R. eutropha* の PHB 生合成遺伝子を大腸菌に導入したある組換え株は、従来では合成できなかった分子量 2000 万以上の超高分子量 P(3HB)を合成したことが報告されている^{71, 72)}。このような超高分子量 P(3HB)は、延伸熱処理を施すことによ

り、ナイロン6,6などの汎用高分子と同程度にまで物性が改善したという報告があり、研究が進められている。

1-7 二酸化炭素からの PHA 生産

近年、温室効果ガスによる地球温暖化の問題が深刻化していることは世界全体の認識となりつつある。温暖化の原因は、①化石燃料の過剰使用が8割、②森林破壊が2割と推定されている。すでに現在においても、温暖化の影響は生態系にも現れ、米の生育不良や品質低下、漁獲量の減少、サンゴ礁の白化などが深刻化している。この昨今の地球環境問題の現状を受け、国際的にも動きがあり、1997年に締約された京都議定書において、日本は2008年から2012年までの4年間に6%の二酸化炭素削減のノルマ達成を課せられた^{8, 73)}。2011年には、気候変動枠組条約第17回締約国際会議(COP 17)が開催され、新興国を含む温室効果ガスの主要な排出国が排出削減義務を負う、京都議定書に代わる新たな国際的枠組への工程に関する国際合意がなされた⁷⁴⁾。このことから、地球温暖化防止に向けた温室効果ガスの削減が大きな課題となっている。これまでに、生分解性プラスチックは廃棄物や環境汚染などの問題の解決策として開発されてきた。それに加え、現在は温室効果ガスの一つである二酸化炭素の削減という背景から、大気中の二酸化炭素を直接あるいは間接的に利用して生分解性プラスチックを生産できれば、二酸化炭素の排出を抑制できると考えられ、さまざまな研究がなされている。二酸化炭素を出発原料とする高分子生産プロセスとして3つの方法があげられる (Fig. 1-11)⁷⁵⁾。

間接的に二酸化炭素を利用する例として、植物由来のバイオマス(糖や植物油)を炭素源に用いて微生物から生産されるバイオマスプラスチックがあげられる。このバイオマスを用いてのプラスチックの生産工程は3ステップ生産法または2ステップ生産法のいずれかにあたる。3ステップ生産法は、植物によって大気中の二酸化炭素をデンプンなどの糖へと変換し、これを原料として微生物発酵によりモノマー生産を行い、そのモノマーを用いて化学合成によりポリマーを合成する方法である。2ステップ生産法は、微生物により糖や植物油からポリマーを生産する方法である。2ステップ生産法は、3ステップ生産法に比べて、生産工程が簡略化でき、低コスト化が期待できる^{75, 76)}。しかしながら、さらなる高生産性と低コスト化を目指す方法として二酸化炭素から直接ポリマーを生産させる1ス

テップ生産法がある。近年、遺伝子組換え植物により PHA を合成する技術開発が進められている。代表的な例として、1992 年のシロイヌナズナを用いた P(3HB)生産が挙げられる⁷⁷⁾。初めは、その生産量もごくわずかであったが、植物細胞内で脂肪酸合成などを行う細胞小器官のプラスチドに P(3HB)生合成酵素を局在化させることにより、乾燥重量あたり 14%の P(3HB)が蓄積されることが報告されている⁷⁸⁾。さらに葉緑体に局在化させることにより、乾燥重量の約 40%も P(3HB)を蓄積するが、植物体の成長が著しく悪くなるという報告もある⁷⁹⁾。組換え植物体を用いての PHA 生産の研究は始まったばかりであり、実用化には克服すべき多くの課題が残っている。

一方、*R. eutropha* は、二酸化炭素からすべての生体炭素構成成分を合成し、二酸化炭素を固定することのできる化学合成独立栄養細菌である。そこで、私たちは、*R. eutropha* に着目し、*R. eutropha* の組換え株を用いて、二酸化炭素から好ましいモノマー組成を有する丈夫で実用的な PHA を合成しようと試みている。これまでに、*R. eutropha* PHB4 に *phaC1_{Ps}* 遺伝子と *phbAB_{Re}* 遺伝子を *lac* プロモーターで発現させるプラスミドを導入した組換え株で二酸化炭素を炭素源として P(3HB)を 9~13 wt%合成することに成功している（稲田, 未発表）。二酸化炭素からの PHA 生産過程では、水素をエネルギー源として使用するため危険であることや培養条件が確立されていないなどの実用化に向けての課題も多くある。しかしながら、二酸化炭素からの PHA 合成が実用化できれば、高度環境調和型 PHA 生産システムを構築できると考えられる。

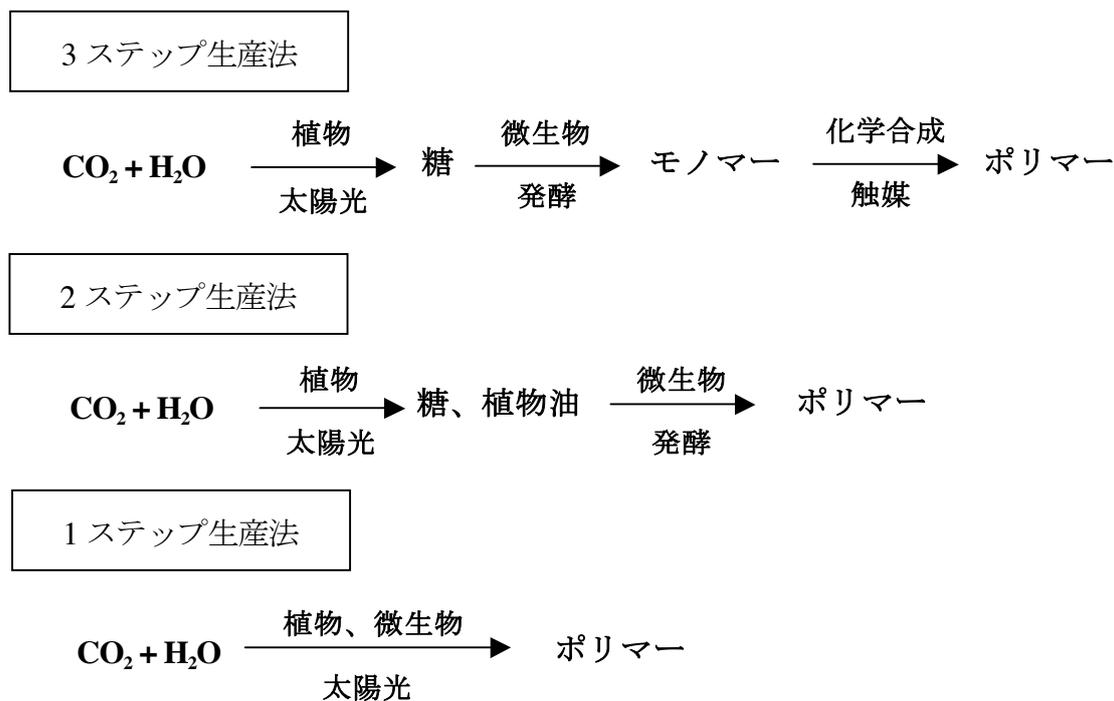


Fig. 1-11 二酸化炭素からの生分解性高分子の生産プロセス⁷⁵⁾

1-8 大腸菌を宿主とした共重合ポリエステルの合成

大腸菌は、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上に、菌体内 PHA 分解酵素を有さない非 PHA 生産菌であることから、PHA 生産における宿主として期待できる。これまでに、大腸菌を宿主として、3HV や 4HB、乳酸、中鎖長 3HA をセカンドモノマーユニットとして含み、3HB ユニットのベースとした共重合ポリエステルが糖や脂肪酸を炭素源として合成されている^{26,80-87)}。福居らは、*A. cavie* の PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC*) とともに (*R*) 体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ遺伝子 (*phaJ*) を導入し、大腸菌を宿主として β 酸化を介した P(3HB-*co*-3HHx) の生合成について報告している²⁶⁾。また、Park と Lee は、 β 酸化において 3-ケトアシル CoA およびアシル CoA を供給する大腸菌の *fadA* および *fadB* 遺伝子を破壊した株を作製し、グルコン酸とデカン酸から 3HB 分率が 95 mol% の P(3HB-*co*-3HA) の合成に成功している⁸¹⁾。さらに、*R. eutropha* の PhbA および PhbB とともに、基質特異性の異なる PHA 重合酵素 (*R. eutropha* 由来 PhbC、*Aeromonas hydrophila* 由来 PhaC あるいは *P. putida* 由来 PhaC2) と (*R*) 体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ (*A. hydrophila* 由来 PhaJ あるいは *P. putida* 由来 PhaJ1 および PhaJ4) を共発現させることによって、グリ

セロールとドデカン酸から、炭素数が 4~10 のさまざまなモノマー組成を有する P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルも合成されている⁸⁴⁾。大腸菌を宿主として、糖を炭素源とした PHA 合成については、Chen らの報告があり、スレオニン生合成あるいは分解経路に関わる遺伝子を過剰に発現あるいは破壊することによって、キシロースからの P(3HB-co-3HV)の合成に成功している⁸³⁾。また、シトラマル酸経路とスレオニン経路を組み合わせることによって、グルコースから 3HV 分率の高い P(3HB-co-3HV)が合成されている⁸⁶⁾。

これまで 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ていた PhaG は、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示唆された⁸⁸⁾。したがって、PhaG は PHA 重合酵素の基質となる(R)-3HA-CoA を生成するよりもむしろ、(R)-3-ヒドロキシアシルアルカン酸を生成するため、脂肪酸合成経路を介して中鎖長 3HA ユニットの PHA 鎖中へ取り込むためには、(R)-3HA-CoA リガーゼが必要であると考えられる。また、Wang らは、*P. olearans* 由来の AlkK と相同性の高い *P. putida* KT2440 の PP0763 遺伝子の翻訳産物が(R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有していることを明らかにした⁸⁸⁾。さらに、*Pseudomonas* sp. 61-3 の改変 PHA 重合酵素 (PhaC1(STQK))⁸⁹⁾、PhaG、PhbA、PhbB および PP0763 遺伝子の翻訳産物を共発現させることによって、グルコースを唯一の炭素源として中鎖長 3HA ユニットの導入された P(3HB-co-3HA)の合成に成功している⁸⁵⁾。Tappel らのこの報告が糖からの P(3HB-co-3HA)生合成における(R)-3HA-CoA リガーゼに関する初めての報告であり、大腸菌を宿主として、脂肪酸合成経路を介した中鎖長 3HA ユニットの含む P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの合成に関する報告はこの一例のみである⁸⁵⁾。

1-9 研究の目的

多くの微生物がエネルギー貯蔵物質として菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアシルアルカン酸 (PHA) は環境調和型プラスチックとして期待されている。PHA の実用化のためには、PHA の物性を改善し、低コストで生産するシステムを構築することが重要である。したがって、PHA 生合成関連遺伝子の詳細な解析が必須であり、それにより得られた知見を基に、その分子構造や組成を自由にコントロールする必要がある。また、炭素源としてバ

バイオマス資源などの安価な素材を用いることが重要である。

PHA は大きく分類すると、炭素数 4 の 3HB をモノマー単位とするポリヒドロキシブタン酸 P(3HB)と、炭素数 6~14 の中鎖長 3HA をモノマー単位とする P(3HA)に分類される。P(3HB)は硬くて脆い性質を示し、一方、P(3HA)はアモルファスでゴム弾性を示すため、それぞれ単独では実用的なプラスチックとはいえない。しかしながら、3HB ユニットと 3HA ユニットのランダム共重合体 P(3HB-co-3HA)を合成させ、その組成比を変化させることによって、物性の優れた実用的な PHA を合成することが可能となる。そこで、本研究では、二酸化炭素や安価な糖からの物性の優れた実用的な生分解性共重合ポリエステルを合成することを目的とした。そのために、PHA 生合成遺伝子の詳細な解析を行い、各酵素の特性・特徴について明らかにすることや生合成における分子解析を試みた。また、これまでに本研究や他の先行研究における PHA 生合成遺伝子の詳細な解析によって得られた知見を基に、遺伝子組換え菌を作製し、代謝制御を行うことで、二酸化炭素や糖を炭素源として物性の優れた共重合ポリエステルの効率的な合成を試みた。加えて、合成されたポリエステルの物性評価や熱力学的特性についても調べた。

Pseudomonas sp. 61-3 は、炭素数 4 の 3HB からなる P(3HB)ホモポリマーと、炭素数 4~12 の 3HA からなる P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの 2 種類の PHA を合成する^{42,45)}。*Pseudomonas* sp. 61-3 の P(3HB)と P(3HB-co-3HA)の PHA 顆粒にはそれぞれ特異的に結合するタンパク質 Granule-associated protein (GAP) が存在する。PHA 顆粒にはポリエステル重合酵素以外に、分子量 18 kDa の GA18、36 kDa の GA36、24 kDa の GA24、48 kDa の GA48 (porin) が結合することが明らかとなっており、GA18 および GA36 の遺伝子は、*phal* および *phaF* とそれぞれ同定されているが⁴¹⁾、GA24 遺伝子は同定されていない。また、GAP のポリエステルへの局在性が何に起因しているのかについては不明である。そこで、第二章では、GA24 遺伝子およびその周辺領域のクローニングを行った。さらには、さまざまなモノマー組成の共重合 PHA を合成する *Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株を作製し、それぞれの PHA 顆粒に結合する GAP の局在性について検討した。

第三章では、*Pseudomonas* sp. 61-3 の P(3HB)の生合成に関わる *phb* locus 上の *phbR* 遺伝子と *phbP* 遺伝子の間に新たに見いだされた約 3 kb の機能不明 ORF の推定翻訳産物の機能解析を試みた。

第四章では、これまでの PHA 生合成遺伝子の解析により得られた知見を活かした微生物育種の応用例として、組換え微生物による生分解性共重合ポリエステルの生合成を行っ

た。*R. eutropha* は、二酸化炭素を固定することのできる化学合成独立栄養細菌であり、組換え *R. eutropha* を作製し、二酸化炭素から優れた物性を有する共重合ポリエステルが合成できれば、高度環境調和型 PHA 生産システムを構築できると考えられる。しかしながら、*R. eutropha* は、糖や二酸化炭素を唯一の炭素源とした場合、P(3HB)ホモポリマーしか合成しない。そこで、*Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1*)、3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (*phaG*) および *R. eutropha* の β -ケトチオラーゼ遺伝子 (*phbA*)、アセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子 (*phbB*) を導入した組換え株を作製した。そして、従属栄養あるいは独立栄養条件下にて培養した際に合成された PHA の蓄積率およびモノマー組成について調べた。しかしながら、PhaG は、トランスフェラーゼ活性よりもチオエステラーゼ活性が高いことが最近報告された⁸⁸⁾。したがって、中鎖長 3HA ユニットの供給するためには、PhaC1 および PhaG に加えて、(*R*)-3HA-CoA リガーゼが必要であるといえる。

そこで、第五章では、*P. putida* KT2440 の PP0763 遺伝子の翻訳産物が(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性があるとの報告を受け⁸⁸⁾、PP0763 遺伝子と相同性の高い *P. aeruginosa* PAO1 の PA3924 遺伝子をクローニングした。PHA 重合酵素とともに PA3924 遺伝子およびモノマー供給系に関わる酵素遺伝子を増殖が速く、PHA 分解酵素を有さない大腸菌に導入した組換え株を作製し、糖から物性の優れた共重合ポリエステルを効率よく合成させることを試みた。

第六章では、本論文で得られた結果を総括する。

引用文献 第一章

1. 日本プラスチック工業連盟 (<http://www.jpif.gr.jp/>)
2. 一般社団法人プラスチック循環利用協会 (<http://www.pwmi.or.jp/>)
3. 本多淳裕, 進藤秀夫, 柳澤孝成, 石倉豊, 寺本俊郎, 池田文三郎, 村田勝英, 川口一, 元田欽也, 池澤健治, 久保直紀, 上田勉, 犬飼重平, 浅田俊彦, 小島昭, 柏木秀博, 杉浦基之, 高橋正夫 (2000) プラスチックリサイクル技術、シーエムシー出版
4. 白石信夫, 谷吉樹, 工藤謙一, 福田和彦 (2000) 実用化進む生分解性プラスチック 持続・循環型社会の実現に向けて, 工業調査会
5. プラスチックリサイクル研究会編 (2000) 最新プラスチックのリサイクル 100 の知識, 東京書籍
6. 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
7. 生分解性プラスチック研究会編 (2004) 生分解性プラスチックの本, 日刊工業新聞社
8. ブッカーズ編 (2008) バイオプラスチックの高機能化・再資源化技術, エヌ・ティー・エス
9. 土肥義治 (1996) 生分解性プラスチック, 化学と教育, **44**, 441-443
10. 日本バイオプラスチック協会 (<http://www.jbpaweb.net/>)
11. 愛・地球博公式ウェブサイト (<http://www.expo2005.or.jp/jp/index.html>)
12. 田口精一 (2004) バイオプラスチック生産研究の国際動向, 化学経済, 3月号, 32-38
13. 科学技術動向 (2006年, 8月)
(<http://www.nistep.go.jp/achiev/ftx/jpn/stfc/stt065j/index.html>)
14. トヨタ自動車株式会社公式企業サイト (<http://www.toyota.co.jp/>)
15. Lemoigne, M. (1926) Produits de dehydration et de polymerization de l'acide β -oxybutyric. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **8**, 770-782
16. Merrick, J.M. and Doudoroff, M. (1961) Enzymatic synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid in bacteria. *Nature*, **189**, 890-892
17. Anderson, A.J and Dawes, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, **54**, 450-472

18. Wallen, L.L. and Rohwedder, W.K. (1974) Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environ. Sci. Technol.*, **8**, 576-579
19. 土肥義治 (1989) 生物が分解するプラスチック, サイエンス, 12月号, 80-88
20. 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
21. Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M. and Soga, K. (1988) Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 330-334
22. 土肥義治 (1988) 微生物のつくるバイオプラスチック-生命と環境を保全する夢の素材-, 現代化学, 12月号, 44-49
23. 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
24. Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, T. and Doi, Y. (1999) Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain. *FEMS Microbiol. Lett.*, **176**, 183-190
25. 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
26. 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
27. 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
28. 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 β -oxidation. *Int. J. Biol. Macromol.*, **31**, 195-205

29. 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
30. Rehm, B.H.A., Kruger, 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
31. 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
32. 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
33. Mohammadi, M., Hassan, M.A. Phang, L.Y., Ariffin, H., Shirai, Y. and Ando, Y. (2012) Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant *Cupriavidus necator* using water and ethanol. *Biotechnol. Lett.*, **34**, 253-259
34. Mohammadi, M., Hassan, M.A. Phang, L.Y., Ariffin, H., Shirai, Y. and Ando, Y. (2012) Efficient polyhydroxyalkanoate recovery from recombinant *Cupriavidus necator* by using low concentration of NaOH. *Environ. Eng. Sci.*, **29**, 783-789
35. De Smet, M.J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J. and Wynberg, H. (1983) Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.*, **154**, 870-878
36. 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
37. Qi, Q., Rehm, B.H.A. and Steinbüchel, A. (1997) Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoate) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene *phaC2* from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of PhaC1 and PhaC2. *FEMS Microbiol. Lett.*, **157**, 155-162

38. 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
39. Hein, S., Paletta J.R.J. and Steinbüchel, A. (1997) Cloning, characterization and comparison of the *Pseudomonas mendocina* polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 229-236
40. Chen, J.Y., Liu, T., Zheng, Z., Chen, J.C. and Chen, G.Q. (2004) Polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas stutzeri* 1317 had different substrate specificities. *FEMS Microbiol. Lett.*, **234**, 231-237
41. Matsumoto, K., Matsusaki, H., Taguchi, K., Seki, M. and Doi, Y. (2002) Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, **3**, 787-792
42. 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
43. 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
44. Kato, M., Fukui, T. and Doi, Y. (1996) Biosynthesis of polyester blends by *Pseudomonas* sp. 61-3 from alkanolic acids. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 515-520
45. Fukui, T., Kato, M., Matsusaki, H., Iwata, T. and Doi, Y. (1998) Morphological and ¹³C-nuclear magnetic resonance studies for polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas* sp. 61-3. *FEMS Microbiol. Lett.*, **164**, 219-225
46. Holmes, P.A. (1985) Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.*, **16**, 32-36
47. Matsusaki, H., Abe, H. and Doi, Y. (2000) Biosynthesis and properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, **1**, 17-22

48. Matsusaki, H., Abe, H., Taguchi, K., Fukui, T. and Doi, Y. (2000) Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas* sp. 61-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 401-409
49. Griebel, R., Smith, Z. and Merrick, J.M. (1968) Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry*, **7**, 3676-3681
50. Lundgren, D.G., Pfister R.M. and Merrick, J.M. (1964) Structure of poly- β -hydroxybutyric acid granules. *J. Gen. Microbiol.*, **34**, 441-446
51. Barnard, G.N. and Sanders, J.K. (1989) The poly- β -hydroxybutyrate granule *in vivo*. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3286-3291
52. Anderson, A.J. and Dawes E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, **54**, 450-472
53. Kawaguchi, Y. and Doi, Y. (1990) Structure of native poly(3-hydroxybutyrate) granules characterized by X-ray diffraction. *FEMS Microbiol. Lett.*, **70**, 151-155
54. Horowitz, D.M., and Sanders, J.K.M. (1995) Biomimetic, amorphous granules of polyhydroxyalkanoates: composition, mobility, and stabilization *in vitro* by proteins. *Can. J. Microbiol.*, **41** (Suppl. 1), 115-123
55. Dunlop, W.F. and Robards A.W. (1973) Ultrastructural study of poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, **114**, 1271-1280
56. Pieoer-Fürst, U., Madkour, M.H., Mayer, F. and Steinbüchel, A. (1994) Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. *J. Bacteriol.*, **176**, 4328-4337
57. Mayer, F., and Hoppert, M. (1997) Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer. *J. Basic Microbiol.*, **37**, 45-52
58. Stuart, E.S., Fuller, R.C. and Lenz, R.W. (1995) The ordered macromolecular surface of polyester inclusion bodies in *Pseudomonas oleovotans*. *Can. J. Microbiol.*, **41**, 84-93

59. Gerngross, T.U., Reilly, P., Stubbe, J., Sinskey, A.J. and Peoples, O.P. (1993) Immunocytochemical analysis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: Localization of the synthase enzyme at the surface of PHB granules. *J. Bacteriol.* **175**, 5289-5293
60. Wieczorek, R., Pries, A. Steinbüchel, A. and Mayer, F. (1995) Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.*, **177**, 2425–2435
61. York, G.M., Junker, B.H., Stubbe, J.A. and Sinskey, A.J. (2001) Accumulation of the PhaP phasing of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. *J. Bacteriol.*, **183**, 4217–4226
62. Neumann, L., Spinozzi, F., Sinibaldi, R., Rusticheli, F., Pöter, M. and Steinbüchel, A. (2008) Binding of the major phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to poly(3-hydroxybutyrate) granules. *J. Bacteriol.*, **190**, 2911-2919
63. Schembri, M.A., Woods, A.A., Bayly, R.C. and Davies, J.K. (1995) Identification of a 13-kDa protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules from *Acinetobacter* spp. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **133**, 277–283
64. Liebergesell, M. and Steinbüchel, A. (1992) Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D. *Eur. J. Biochem.*, **209**, 135-150
65. McCool, G.J. and Cannon, M.C. (1999) Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, **181**, 585-592
66. Maehara, A., Ueda, S., Nakano, H. and Yamane, T. (1999) Analysis of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the *pha* locus of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bacteriol.*, **181**, 2914-2921
67. Prieto, M.A., Bühler, B., Jung, K., Witholt, B. and Kessler, B. (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J. Bacteriol.*, **181**, 858–868
68. Ushimaru, K., Motoda, Y., Numata, K. and Tsuge, T. (2014) Phasin proteins activate *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase but not *Ralstonia eutropha* PHA synthase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 2867-2873

69. Slater, S., Houmiel, K.L., Tran, M., Mitsky, T.A., Taylor, N.B., Padgett, S.R. and Gruys, K.J. (1998) Multiple β -ketothiolases mediate poly(β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.*, **180**, 1979-1987
70. 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
71. Kusaka, S., Abe, H., Lee, S.Y. and Doi, Y. (1997) Molecular mass of poly((R)-3-hydroxybutyric acid) produced in a recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 140-143
72. 岩田忠久, 日下聡, 土肥義治 (1999) 遺伝子組換え大腸菌による超高分子量生分解性ポリエステル合成とその性質, *高分子加工*, **48**, 434-439
73. 大塚徳勝 (2010) 知らないと怖い環境問題 (『知っておきたい環境問題』改訂改題), 共立出版
74. 科学技術動向 (2012年, 3・4月号) (<http://hdl.handle.net/11035/2291>)
75. 土肥義治 (2001) 生分解性プラスチック (グリーンプラ) の新しい展開, *サイエンスネット*, **13**, 2-5
76. 柘植丈治, 土肥義治 (2000) バイオプロセスによる生分解性プラスチックの生産, *化学工業*, **51**, 423-428
77. Poirier Y., Dennis, D.E., Klomparens, K. and Somerville, C. (1992) Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science*, **256**, 520-523
78. Nawrath, C., Poirier, Y. and Somerville, C. (1994) Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12760-12764
79. Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorf, V., Nawrath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R.N. and Willmitzer, L. (2000) Transgenic *Arabidopsis* plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight. *Planta*, **211**, 841-845
80. Valentin, H.E. and Dennis, D. (1997) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. *J. Biotechnol.*, **58**, 31-33

81. Park, S.J. and Lee, S.Y. (2004) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Appl. Biochem. Biotech.*, **114**, 335-346
82. 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.*, **105**, 17323-17327
83. Chen, Q., Wang, Q., Wei, G., Liang, Q. and Qi, Q. (2011) Production in *Escherichia coli* of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with differing monomer compositions from unrelated carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 4886-4893
84. 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
85. 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 Sustainable Chem. Eng.*, **2**, 1879-1887
86. Wang, Q., Liu, X. and Qi, Q. (2014) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose with elevated 3-hydroxyvalerate fraction via combined citramalate and threonine pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 3923-3931
87. Yang, J.E., Choi, Y.J, Lee, S.J., Kang, K.H., Lee, H., Oh, Y.H., Lee S.H., Park, S.J. and Lee, S.Y. (2014) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 95-104
88. 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

89. Taguchi, S. and Doi, Y. (2004) Evolution of polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by “enzyme evolution”: successful case studies of directed evolution. *Macromol. Biosci.*, **4**, 146-156

第二章

Pseudomonas sp. 61-3 のポリヒドロキシ

アルカン酸顆粒結合タンパク質遺伝子の

クローニングと顆粒結合タンパク質の局在性

2-1 緒言

PHA は、微生物細胞内に顆粒として蓄積される¹⁾。その PHA 顆粒表面には、顆粒と特異的に結合する顆粒結合タンパク質 (GAP; granule-associated protein) が存在する²⁾。GAP は、PHA 顆粒の安定性に関わるだけでなく、PHA 生合成遺伝子の転写調節に関与しているものや^{3,4)}、また PHA 重合酵素の活性を高めるものも知られており⁵⁾、GAP の詳細な機能解析が必要である。*Pseudomonas* sp. 61-3 は、炭素数 4 の 3HB からなる P(3HB)と炭素数 4~12 の 3HA からなる P(3HB-co-3HA)の 2 つの PHA を同一菌体内に合成し、それぞれの顆粒に特異的に結合する GAP が存在する (Fig. 1-10)⁶⁾。PHA 顆粒にはポリエステル重合酵素以外に、分子量 18 kDa の GA18、36 kDa の GA36、24 kDa の GA24、48 kDa の GA48 (porin) が結合することが明らかとなっており、GA18 および GA36 の遺伝子は、*phbI_{ps}* および *phaF_{ps}* とそれぞれ同定されているが⁶⁾、GA24 遺伝子は同定されていない。これまでに P(3HB)生合成遺伝子クラスターの配置が、*Pseudomonas* sp. 61-3 と同一である *Azotobacter vinelandii* UW 136 において、GA24 のアミノ酸配列と相同性を示すタンパク質 *PhbP_{Av}* の遺伝子が、*phbR_{Av}* 遺伝子の下流に存在すると報告されており⁷⁾、*Pseudomonas* sp. 61-3 においても GA24 遺伝子が *phbR_{ps}* 遺伝子の下流に存在すると予想した。そこで、GA24 の N 末端アミノ酸配列から degenerate プライマーを作製し、既知の調節タンパク質遺伝子 (*phbR_{ps}*) の塩基配列プライマーとの PCR を試みた。さらに、PCR により得られた GA24 遺伝子をプローブとして、本菌のゲノム DNA ライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションを行い、GA24 遺伝子の周辺領域のクローニングも試みた。

また、*Pseudomonas* sp. 61-3 において、P(3HB)と P(3HB-co-3HA)の 2 つの PHA 顆粒に GAP がどのように局在しているのかについては明らかになっていない。そこで、さまざまなモノマー組成の共重合 PHA を合成する本菌の組換え株を作製し、PHA のモノマー組成と GAP の局在性について検討した。

2-2 実験操作

2-2-1 使用菌株および使用プラスミド

本研究で使用した菌株およびプラスミドを Table 2-1 に示した。

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る。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℃ で保存する。また、菌株を長期保存する場合は-80℃ で保存を行う。

実験期間中の短期の保存には、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℃ で保存し、3 週間毎に植え継ぎを行う。

Table 2-1 使用菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3	Wild type	JCM 10015, 8)
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3 (<i>phbC::tet</i>)	Inactivation of chromosomal <i>phbC_{Ps}</i> by integration of Tc ^r ; <i>phbC_{Ps}</i> -negative mutant	8)
<i>Pseudomonas</i> sp. AC1-TnK	<i>phaCI::kan</i> (Tn10), Km ^r	This study
<i>Pseudomonas</i> sp. BCG-TcGm	Inactivation of chromosomal <i>phbC_{Ps}</i> and <i>phaG_{Ps}</i> by integration of Tc ^r and Gm ^r , respectively; <i>phbC_{Ps}</i> - and <i>phaG_{Ps}</i> -negative mutant	9)
<i>E. coli</i> DH5α	<i>deoR endaAI gyrA96 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>relAI supE thi-1 Δ(lacZYA-argFVI69)</i> ø80 Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15F</i> λ	Clontech
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA</i> and <i>tra</i> genes of plasmid RP4 integrated into the chromosome; auxotrophic for proline and thiamine	10)
<i>E. coli</i> S17-1 (<i>Ap^r</i>)	π protein encoded by R6K integrated into chromosome	11)
plasmids		
pBluescript II KS ⁺	Ap ^r <i>lacPOZ</i> T7 and T3 promoter	Stratagene
pT7Blue T-vector	Ap ^r , <i>lacPOZ</i>	Novagen
pLA2917	Km ^r , Tc ^r , cosmid cloning derivatives of pLA2901	12)
pJASc22	pJRD215 derivative; <i>phaCI_{Ps}</i>	8)
pJKSc54- <i>phab</i>	pJRD215 derivative; <i>pha_{Ps}</i> promoter, <i>phaCI_{Ps}</i> , <i>phb_{Re}</i> promoter, <i>phbA_{Re}</i> , <i>phbB_{Re}</i>	13)
pJKSc46- <i>pha</i>	pJRD215 derivative; <i>pha_{Ps}</i> promoter, <i>phaCI_{Ps}</i> , <i>phbA_{Re}</i> , <i>phbB_{Re}</i>	13)
pBSEX22	pBluescript II KS ⁺ derivative; <i>pha_{Ps}</i> promoter, <i>phaCI_{Ps}</i>	13)
pBSL180	Ap ^r , Km ^r , R6K replicon, suicide, <i>lacI^q</i> , <i>tnp</i> (Tn10), mob ⁺ , IS10	11)
pSLBE13dC1	pBSL180 derivative containing the 1.3-kb <i>Bg/II-EcoRI</i> fragment of pBSEX22	This study

2-2-3 GA24 遺伝子のクローニング

A. vinelandii UW136 において、P(3HB)生合成遺伝子クラスターの配置が *Pseudomonas* sp. 61-3 と同一であること、さらに GA24 の N 末端アミノ酸配列と相同性を示す PhbP_{Av} の遺伝子が、*phbR_{Av}* 遺伝子の下流に存在すると報告されていることから⁷⁾、*Pseudomonas* sp. 61-3 においても GA24 遺伝子が *phbR_{ps}* 遺伝子の下流に存在すると予想し、GA24 遺伝子の PCR クローニングを試みた。まず、既知の調節タンパク質遺伝子 (*phbR_{ps}*) の下流配列と GA24 の N 末端アミノ酸配列 (NH₂-(M)TFFNLEKLQDAQKANLDLLQQISGKIFASVEQLT)⁹⁾ からプライマー、*phbRDS-f1* および GA24-r1 を作製し (Table 2-2)、PCR を行った (Tables 2-3 and 2-4)。

Table 2-2 使用プライマー

Primer	Sequence
<i>phbRDS-f1</i>	5'-TTCCTTGTTGAAGGCTCATTGAGGCGTTCAT-3'
GA24-r1	5'-TG(T/C)TClACIG(A/T)IGC(A/G)AA(A/G/T)AT(T/C)TT-3'

Table 2-3 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
2 × GC buffer I (Mg ²⁺ plus)	25	1 ×
2.5 mM dNTP	8	1 mM each
<i>phbRDS-f1</i> (10 μM)	1	0.2 μM
GA24-r1 (10 μM)	3	0.6 μM
Template DNA	x	< 1 μg
TaKaRa LA Taq (5 units/μL)	0.5	2.5 units/50 μL
滅菌水	up to 50	

Table 2-4 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	5 min
Denature	94°C	1 min
Anneal	40°C	1 min
Extend	72°C	3 min (to step 2 × 30)
Cool	4°C	∞

- ・使用酵素

- TaKaRa LA Taq with GC buffer (TaKaRa)

得られた約 3-kb の増幅産物を pT7Blue T-vector にクローニングした。rTaq DNA Polymerase (TOYOBO) を用いたコロニーPCR に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、DNA シークエンシングを行った。そして、pT7-3-kb GA24-r1-phbRDS-f1-R を取得した。次に、制限酵素処理を行い、pT7-3-kb GA24-r1-phbRDS-f1-R のサブクローンを作製し、DNA シークエンシングを行った。

次に、pT7-3-kb GA24-r1-phbRDS-f1-R にクローニングされている GA24 遺伝子の配列を基に作製した GA24-f2 と GA24-f3 のプライマー (Tables 2-5 and 2-8) で、*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA を鋳型とした LA PCR *in vitro* Cloning Kit (TaKaRa) を用いた nested PCR により、GA24 遺伝子の下流域をクローニングした。まず、*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA を *SalI* および *EcoRI* で消化し、それぞれの制限酵素に対応する制限酵素サイトを持つカセットとライゲーション反応により連結させた。次に、ライゲーション反応後の DNA 溶液を用いて、カセットプライマー (Primer C1) と GA24-f2 プライマーで 1 回目の PCR を行った (ファースト PCR) (Tables 2-6 and 2-7)。その後、それぞれのファースト PCR 反応液を滅菌水で適宜希釈 (原液 \sim 10⁴倍希釈液) し、カセットプライマー (Primer C2) と GA24-f3 を用いて、ファースト PCR と同条件で 2 回目の PCR を行った (セカンド PCR) (Tables 2-7, 2-8 and 2-9)。特異的な増幅が確認された *SalI* 処理サンプルのセカンド PCR の反応液から、0.7-kb の増幅バンドを切り出し、pT7Blue T-vector にクローニングした。そのプラスミドで *E. coli* JM109 を形質転換したコロニーを LA Taq with GC buffer を用いたコロニーPCR に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るコロニー2 つからプラスミドを抽出し、DNA シークエンシングを行った。この 2 つのプラスミドは、それぞれ逆向きに遺伝子が挿入されており、pT7-GA24(LA)-F および pT7-GA24(LA)-R と命名した。さらに、pT7-GA24(LA)-R を *SalI* で消化後、0.7-kb を切り出し、pBluescript II KS⁺にクローニングしたサブクローン pBS-GA24(LA)を作製し、DNA シークエンシングを行った。

【DNA の制限酵素消化】

- 1) 下記の反応液を調製し、37°C で一晩インキュベートする。

ゲノム DNA	5 μ g
制限酵素	5 μ L
10 \times H buffer	40 μ L
滅菌水	Up to 50 μ L

- 2) 反応終了後、3 M 酢酸ナトリウムを 40 μ L と、1 mL の 100%冷エタノールを加え、エタノール沈殿を行う。
- 3) エタノール沈殿後、乾燥させた沈殿物を、10 μ L の滅菌水に溶解する。

【ライゲーション反応】

- 1) 下記の反応液を調製し、16°C で 30 分～一晩インキュベートする。

DNA の制限酵素消化で調製した DNA 溶液	5 μ L
Cassette (10 μ M)	2.5 μ L
Ligation high Ver. 2 (TOYOBO)	7.5 μ L

- 2) 反応終了後、エタノール沈殿を行い、5 μ L の滅菌水に溶解する。

【PCR による増幅反応】

・ 操作

- 1) ライゲーション反応で調製した DNA 溶液 1 μ L に滅菌水 13.5 μ L を加え、94°C で 10 分間の熱変性を行う。
- 2) 下記の条件で 1 回目の PCR を行う (Tables 2-5, 2-6 and 2-7)。

Table 2-5 使用プライマー

Primer	Sequence
GA24-f2	5'-AACTTGGAGAAATTGCAAGACGCT-3'
Cassette primer C1	5'-GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCA-3'

Table 2-6 反応組成液

Components	Volume (μL)
熱変性 DNA 溶液	14.5
2 × GC Buffer I (Mg^{2+} plus)	25
TaKaRa LA Taq	0.5
dNTP Mixture	8
Cassette primer C1	1
GA24-f2	1
滅菌水	up to 50 μL

Table 2-7 サイクリング条件

a) <4 kb の場合

	Temperature	Time
Preheat	94°C	5 min
Denature	94°C	1 min
Anneal	55°C	1 min
Extend	72°C	4 min (to step 2 × 30)
Cool	4°C	∞

b) ≥ 4 kb の場合

	Temperature	Time
Preheat	96°C	5 min
Denature	96°C	20 sec
Anneal · Extend	68°C	15 min (to step 2 × 30)
Cool	4°C	∞

・使用酵素

TaKaRa LA Taq with GC buffer (TaKaRa)

- 3) 2)の反応液のうち、滅菌水で適宜希釈したもの（原液 $\sim 10^4$ 倍希釈液）1 μL を用いて Tables 2-7、2-8 and 2-9 の条件で2回目のPCRを行う。

Table 2-8 使用プライマー

Primer	Sequence
GA24-f3	5'-CAACCTAGACCTCCTGCAGCAAAT-3'
Cassette primer C2	5'-CGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'

Table 2-9 反応組成液

Components	Volume (μ l)
1 回目の PCR 反応液の順次希釈液	1
2 × GC Buffer I (Mg ²⁺ plus)	25
TaKaRa LA Taq	0.5
dNTP Mixture	8
Cassette primer C2	1
GA24-f3	1
滅菌水	up to 50 μ L

次に、上記において得られた PCR 産物をプローブとして本菌のゲノム DNA ライブラリーからの GA24 遺伝子およびその周辺領域のクローニングを行った。プローブ (Gene Images CDP-Star Detection Kit (GE Healthcare) 使用) として、GA24 遺伝子 (0.5-kb GA24 断片) および GA24 と *phbR* 遺伝子下流域の間の 3-kb (3-kb GA24-*phbR*RDS 断片) を用いた。0.5-kb GA24 断片は、pT7-GA24(LA)-F を鋳型として、GA24-f3 および GA24-r3 プライマー (Table 2-10) を用いた PCR を行い (Tables 2-11 and 2-12)、0.5-kb の増幅産物をゲルから切り出して取得した。また、3-kb GA24-*phbR*RDS 断片は、プラスミド pT7-3-kb GA24-r1-*phbR*RDS-f1-R を鋳型として、*phbR*RDS-f1 および GA24-r2 プライマー (Table 2-13) で PCR を行い (Tables 2-14 and 2-15)、3-kb の増幅産物を切り出して取得した。まず、0.5-kb GA24 断片を用いて本菌のゲノム DNA ライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションを行った。一次スクリーニングから 4 個のコロニーを選抜し、二次スクリーニングを行い、二次スクリーニングで強い感光を示したコロニーを 8 個選抜し、三次スクリーニングを行った。強い感光を示した 2 つのクローンを pLA2917Ps1-4 および pLA2917Ps8'-4 と命名し、これらのプラスミドを抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行った。次に、pLA2917Ps8'-4 からサブクローンを作製し、7.6-kb *Hind*III 断片および 6.9-kb *Sac*I 断片を pBluescript II KS⁺に挿入し、*E. coli* DH5 α を形質転換した。これらのサブクローンより、セルフライゲーションや目的とする DNA 断片をゲルから切り出して、さらにサブクローンを作製し、その両鎖の DNA

シーケンシングを行った。さらに、GA24 遺伝子の周辺領域のクローニングを進めるために、3-kb GA24-phbRDS 断片をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行った。

Table 2-10 使用プライマー

Primer	Sequence
GA24-f3	5'-CAACCTAGACCTCCTGCAGCAAAT-3'
GA24-r3	5'-TTACTTGTTACCGCTTGTTGCCTTGCCAGT-3'

Table 2-11 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
10 \times PCR buffer for rTaq (Mg ²⁺ plus)	5	1 \times
2 mM dNTPs	5	0.2 mM each
GA24-f3 (10 μM)	2.5	0.5 μM
GA24-r3 (10 μM)	2.5	0.5 μM
Template DNA	x	0.2~0.5 μg
rTaq DNA Polymerase	0.5	2.5 units/50 μL
滅菌水	up to 50 μL	

Table 2-12 サイクリング条件

	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 \times 30)
Cool	4°C	∞

・使用酵素

rTaq DNA Polymerase (TOYOBO)

Table 2-13 使用プライマー

Primer	Sequence
phbRDS-f1	5'-TCCCTTGTGAAGGCTCATTGAGGCGTTCAT-3'
GA24-r2	5'-GCCGCTGATTTGCTGCAGGAGGTCTAGGTT-3'

Table 2-14 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
2 × GC buffer I (Mg^{2+} plus)	25	1 ×
2.5 mM dNTPs	8	1 mM each
phbRDS-f1 (10 μM)	1	0.2 μM
GA24-r2 (10 μM)	3	0.6 μM
Template DNA	x	<1 μg
TaKaRa LA Taq	0.5	2.5 units/50 μL
滅菌水	up to 50 μL	

Table 2-15 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	5 min
Denature	94°C	1 min
Anneal	64°C	1 min
Extend	72°C	3 min (to step 2 x 30)
Cool	4°C	∞

- ・使用酵素

TaKaRa LA Taq with GC buffer (TaKaRa)

次に、*phbP_{ps}* 遺伝子 (GA24 遺伝子) の塩基配列をもとに GA24-r3(TAA)プライマーを合成し、*phbR_{ps}* 遺伝子下流域にアニールする *phbRDS-f1* プライマーを用いて、PCR を行い、*phbP_{ps}* 遺伝子と *phbR_{ps}* 遺伝子の間の領域のクローニングを試みた (Tables 2-16, 2-17 and 2-18)。得られた PCR 産物を用いて、アガロースゲル電気泳動を行い、約 3-kb の DNA 断片を切り出し、GENECLEAN KIT (BIO 101)を用いてゲルから DNA を抽出後、kination 反応を行った。その後、*EcoRV* で消化し、アルカリフォスファターゼ処理を行った pBluescript II KS⁺とライゲーション反応を行った。得られたクローンについて、DNA シークエンシ

グによって目的の DNA 領域がクローニングされていることを確認し、作製したプラスミドを pBS-3.7-kb GA24-r3-phbRDS-f1-R と命名した。pBS-3.7-kb GA24-r3-phbRDS-f1-R をアルカリ SDS 法により抽出後、さまざまな制限酵素 (Table 2-19) で消化し、サブクローンを作製した。制限酵素処理あるいはコロニーPCR を行い、インサートチェックを行った。その後、インサートチェックにより目的のものが導入されていると思われるコロニーより、プラスミド抽出を行い、DNA シークエンシングを行って、塩基配列を決定した。

Table 2-16 使用プライマー

Primer	Sequence
phbRDS-f1	5'-TTCCTTGTGAAGGCTCATTGAGGCGTTCAT-3'
GA24-r3(TAA)	5'-TTACTTGTTACCGCTTGTTGCCTTGCCAGT-3'

Table 2-17 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
5 \times PrimeSTAR Buffer	10	1 \times
2.5 mM dNTP (dNTP Mix)	4	0.2 mM each
phbRDS-f1 (10 μM)	1.5	0.3 μM
GA24-r3(TAA) (10 μM)	1.5	0.3 μM
Template DNA	x	< 200 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 units/ μL)	0.5	1.25 units/50 μL
滅菌水	up to 50	

Table 2-18 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	1 min
Denature	94°C	15 sec
Anneal	64°C	15 sec
Extend	72°C	3 min (to step 2 \times 30)
Extend	72°C	15 min
Cool	4°C	∞

・使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

Table 2-19 使用した制限酵素

制限酵素		Buffer	反応最適温度
<i>Pst</i> I	(TOYOBO)	H buffer	37°C
<i>Hind</i> III	(TOYOBO)	M buffer	37°C
<i>Eco</i> RV	(TOYOBO)	H buffer	37°C
<i>Eco</i> RI	(TOYOBO)	H buffer	37°C
<i>Sal</i> I	(TOYOBO)	H buffer	37°C
<i>Kpn</i> I	(TOYOBO)	L buffer	37°C
<i>Sac</i> I	(TOYOBO)	L buffer	37°C
<i>Sma</i> I	(TOYOBO)	<i>Sma</i> I 用 buffer	30°C
<i>Bam</i> HI	(TOYOBO)	H buffer	37°C

2-2-4 *phaC1_{ps}* 遺伝子破壊株 (*Pseudomonas* sp. C1-TnK) の作製

本研究では、GAP の局在性が何に起因するのかを調べるために、さまざまなモノマー組成からなる共重合 PHA を合成させる必要がある。また、ポリエステル重合酵素との相互作用についても検討するために、*Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaC1_{ps}* 遺伝子あるいは *phbC_{ps}* 遺伝子を破壊した組換え株を宿主とした。*phbC_{ps}* 遺伝子破壊株については、松崎らによって作製された *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*) を使用した⁸⁾。本研究では、*phaC1_{ps}* 遺伝子破壊株を作製した。*phaC1_{ps}* 遺伝子の破壊をトランスポゾンによる相対的組換えにより行うために、IS 配列を有する自殺ベクター pBSL180 を用いた。宿主には、pBSL180 を保持することができる *E. coli* S17-1(λ pir) を使用した。まず、プラスミド pBSEX22 を *Bgl*III および *Eco*RI で消化し、得られた *phaC1_{ps}* 遺伝子の一部を含む 1.3-kb *Bgl*III-*Eco*RI 断片を、*Bgl*III および *Eco*RI で消化して、アルカリフォスファターゼ処理した pBSL180 ベクターとライゲーションした。上記のように作製したプラスミドを pSLBE13dC1 と命名した。pSLBE13dC1 を保持した *E. coli* S17-1(λ pir) を *Pseudomonas* sp. 61-3 を宿主として、松本らの方法⁹⁾と同様に接合伝達を行い (Appendix 参照)、宿主の染色体上の *phaC1_{ps}* 遺伝子を破壊した (*Pseudomonas* sp. C1-TnK)。 *E. coli* S17-1 には、伝達性因子 *tra* が組み込まれている。一方、使用したプラスミドには、他動伝達性遺伝子 *mob* 領域が組み込まれており、2 つが存在した状態で別の宿主を混合するとプラスミドが他の宿主に伝達される。これを利用して組換え株を作製する。その他、エレクトロポレーション法により、宿主に目的プラスミドを導入する手法もある

が、一般的にグラム陰性菌では、この接合伝達法がよく用いられる。

宿主の目的遺伝子が破壊されているかについては、1.3-kb *BglIII-EcoRI* 断片を用いて、*phbC1_{ps}* 遺伝子のプローブを作製し、サザンハイブリダイゼーションによって確認した (DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche) 使用)。

2-2-5 遺伝子組換え株の作製

野生株および遺伝子組換え株のほかに、さまざまなモノマー組成比の PHA を合成する組換え株を作製し、GAP のポリエステルへの局在性について検討した。*E. coli* S17-1 を介した接合伝達法を用いて、プラスミド pJASc22、pJKSc46-*pha* および pJKSc54-*phab* を *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)、*Pseudomonas* sp. AC1-TnK あるいは *Pseudomonas* sp. BCG-TcGm に導入した組換え株を作製した。

2-2-6 顆粒結合タンパク質の単離

MS 培地で *Pseudomonas* sp. 61-3 およびその遺伝子組換え株を 28°C、増殖の程度により 48 時間または 72 時間培養後、遠心分離 (7,700 g、5 min、4°C) により集菌し、菌体を約 130 mL の 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) で 2 回洗浄を行った。その後、再度遠心分離により集菌し、2 mL の 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) に懸濁した。菌体懸濁液を氷上で低温に保ち、インターバルをとりながら超音波破碎機で菌体を破碎した (30 W、10 sec、20 回)。菌体の破碎を位相差顕微鏡で確認した。次に、スクロース密度勾配 (5 mL の超遠心チューブに 2 M、1.67 M、1.33 M、1 M スクロース (in 0.1 M Tris-HCl、pH 7.5) を各 1 mL ずつ積層) を作製し、その上に菌体破碎物 1 mL を静かにのせ、超遠心分離 (210,000 g (45,000 rpm)、160 min、4°C) を行った。白いバンドで示される 2 種類の顆粒画分 (PHB および PHA 顆粒) をそれぞれ単離した。単離した顆粒画分をさらに遠心チューブの約 7 割容 (約 6.5 mL) の 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) を加え懸濁し、遠心分離 (24,000 g、30 min、4°C) を行った。この操作を 2~3 回繰り返して洗浄し、ポリエステル顆粒を収集した。その後、100~200 μ L の 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) に懸濁し、懸濁液をサンプルとして SDS-PAGE およびガスクロマトグ

ラフィー (GC) による分析を行った。

2-2-7 SDS-PAGE

単離したポリエステル顆粒画分サンプルを 2 × Sample buffer に懸濁して、98°C、10 min 熱変性を行い、電気泳動を行った。分子量マーカには、LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare) を使用し、サンプルはタンパク質量が 15~50 μg となるようにアプライした。150 V で約 90 min 電気泳動を行い、泳動後、CBB 染色を行った (Bio-Safe Coomassie (BIO-RAD))。Appendix-2 protocols 参照。

2-2-8 ガスクロマトグラフィー (GC)

単離したポリエステル顆粒画分サンプルのモノマー組成については、SDS-PAGE 使用後のポリエステル顆粒懸濁液の残り (SDS-PAGE 使用後の残量約 50~100 μL) あるいは、乾燥菌体に含まれる PHA をメタノリシスによって、3-ヒドロキシアルカン酸メチルエステルに変換し、GC を用いて調べた。ガスクロマトグラフ装置は GC-17A (Shimadzu) を、カラムに Inert Cap1 (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した。サンプルの一回の注入量は 1 μL とし、GC 面積の積分には、C-R7A plus CHROMATOPAC (Shimadzu) を用いた。Appendix-2 protocols 参照。

2-3 結果および考察

2-3-1 *phbP_{ps}* および *phbF_{ps}* 遺伝子のクローニングと同定

これまでに P(3HB)生合成遺伝子クラスターの配置が、*Pseudomonas* sp. 61-3 と同一である *Azotobacter vinelandii* UW 136 において、*PhbP_{Av}* の遺伝子が *phbR_{Av}* 遺伝子の下流に存在す

ると報告されており⁷⁾、*Pseudomonas* sp. 61-3 においても GA24 遺伝子が *phbR_{ps}* 遺伝子の下流に存在すると予想し、GA24 遺伝子のクローニングを試みた。まず、*phbR_{ps}* 遺伝子の下流配列と、これまでに明らかとなっている GA24 の N 末端アミノ酸配列 (NH₂-(M)TFFNLEKLQDAQKANLDDLQ)⁹⁾より、*phbRDS-f1* および GA24-r1 プライマーを合成し、PCR を行った。その結果、約 3-kb の増幅産物が得られ、この増幅産物を pT7Blue T-vector にクローニングし、DNA シークエンシングを行った。その結果、pT7-3-kb GA24-r1-*phbRDS-f1-R* のクローンを取得した。次に、制限酵素処理を行い、pT7-3-kb GA24-r1-*phbRDS-f1-R* のサブクローンを作製し、DNA シークエンシングを行った。

次に、GA24 遺伝子全長のクローニングを進めるために、pT7-3-kb GA24-r1-*phbRDS-f1-R* にクローニングされている GA24 遺伝子の配列を基に、GA24-f2 および GA24-f3 プライマーを作製し、*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA を鋳型にして LA PCR *in vitro* Cloning Kit (TaKaRa) を用いた nested PCR を行った。ファースト PCR の結果、サイクル条件が < 4 kb の場合で、*SalI* 処理を行ったサンプルにおいて 0.7 kb の増幅が見られた。一方、サイクル条件が ≥ 4 kb の場合で、*EcoRI* 処理を行ったサンプルにおいて 4 kb および 4.4 kb の増幅がみられた。そこで、それぞれのファースト PCR の反応液を滅菌水で適宜希釈したもの（原液～10⁴倍希釈液）を用いて、ファースト PCR と同条件でセカンド PCR を行った。その結果、*SalI* 処理サンプルでは特異的な増幅が確認されたが、*EcoRI* 処理サンプルでは、特異的な増幅は見られなかった。そこで、*SalI* 処理サンプルのセカンド PCR の反応液から、0.7 kb の増幅バンドを切り出し、pT7Blue T-vector にラーゲーションして、*E. coli* JM109 を形質転換してできたコロニーをコロニーPCR（LA Taq with GC buffer 利用）にてインサートチェックを行った。そして、目的の DNA の導入が期待されるコロニー2つからプラスミドを抽出し、DNA シークエンシングを行った。その結果、アミノ酸レベルで PhaP (*Azotobacter* sp. FA8) と 57%、PhbP (*A. vinelandii* AvOP) と 54%の相同性が明らかとなった^{7,14)}。この抽出した2つのプラスミドをそれぞれ pT7-GA24(LA)-F および pT7-GA24(LA)-R と命名した。また、これらのプラスミドには、さらに PhaR (*A. vinelandii* AvOP) や PhaF (*Azotobacter* sp. FA8) と相同性のある領域が一部含まれていることがわかった^{7,14)}。さらに、pT7-GA24(LA)-R を *SalI* で消化後、0.7-kb を切り出し、pBluescript II KS⁺にクローニングしたサブクローン pBS-GA24(LA)を作製した。DNA シークエンシングを行ったところ、GA24 遺伝子の推定翻訳産物と PhaP (*Azotobacter* sp. FA8) や PhbP (*A. vinelandii* AvOP) との相同性がみられたため、この領域を本菌の GA24 遺伝子であると判断し、*phbP_{ps}* と命名した。

次に、*phbP_{ps}* 遺伝子全長の塩基配列の決定と周辺領域のクローニングを進めるために、*phbP_{ps}* 遺伝子部分をプローブとして、本菌のゲノム DNA ライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションを行った。pT7-GA24(LA)-F にクローニングされている *phbP_{ps}* 遺伝子の配列から GA24-r3 プライマーを合成し、GA24-f3 プライマーとともに pT7-GA24(LA)-F のプラスミドを鋳型として、rTaq DNA Polymerase を用いた PCR を行った。その後、*phbP_{ps}* 遺伝子を含む 0.5-kb の増幅産物を切り出し、0.5-kb GA24 断片をプローブとして、本菌のゲノム DNA ライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションを行った。ゲノム DNA ライブラリーの適正希釈率を調べるため、培養液の 1~10⁸ 倍希釈溶液を LB (Tc) プレートに 200 μ L プレーティングした結果、10⁵ 倍希釈溶液が適正希釈率（コロニー数が 500~1000 個）と判断した。この希釈率で 6 枚の LB (Tc) プレートにプレーティングし、コロニーハイブリダイゼーションを行った（一次スクリーニング）。一次スクリーニングから 4 個 (Clone No. 1、4、7、8) のコロニーを選抜し、二次スクリーニングを行い、二次スクリーニングで強い感光を示したコロニーを 8 個選抜し、三次スクリーニングを行った。その結果から、強い感光を示した 2 つのクローンを pLA2917Ps1-4 および pLA2917Ps8'-4 と命名し、これら 2 つのクローンをポジティブクローンとして選抜した。pLA2917Ps1-4 および pLA2917Ps8'-4 よりプラスミドを抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行った (data not shown)。その結果と制限酵素地図を基に、サブクローンの作製に相当と思われた pLA2917Ps8'-4 からサブクローンを作製した。7.6-kb *Hind*III 断片および 6.9-kb *Sac*I 断片を pBluescript II KS⁺ に挿入し、*E. coli* DH5 α を形質転換した。これらのサブクローンより、セルフライゲーションや目的とする DNA 断片の切り出しでさらにサブクローンを作製し、その両鎖の DNA シークエンシングの結果から、1.9-kb *Sma*I-*Hind*III 領域の塩基配列を決定した。さらに、*phbP_{ps}* 遺伝子の周辺領域、特に、*phbP_{ps}* 遺伝子と *phbR_{ps}* 遺伝子の間の約 3 kb 領域のクローニングを進めるために、*phbRDS-f1* および GA24-r2 プライマーを用いて、PCR を行った (LA Taq with GC buffer 利用)。その後、*phbP_{ps}* 遺伝子と *phbR_{ps}* 遺伝子の間の約 3-kb の増幅産物を切り出し、プローブ (3-kb GA24-*phbRDS* 断片) を作製し、サザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの結果と制限酵素地図より、pLA2917Ps8'-4 には、*phbP_{ps}* 遺伝子および *phbF_{ps}* 遺伝子だけでなく *phbR_{ps}* 遺伝子もクローニングされていると予想された。そこでさらに、*phbP_{ps}* 遺伝子の塩基配列をもとに合成した GA24-r3(TAA) プライマーと *phbR_{ps}* 遺伝子下流域の塩基配列をもとに合成した *phbRDS-f1* プライマーを用いて PCR を行った。その結果、3.7 kb の増幅産物が得られ、こ

れを pBluescript II KS⁺にクローニングし、プラスミド pBS-3.7-kb GA24-r3-phbRDS-f1-R と命名した。次に、pBS-3.7-kb GA24-r3-phbRDS-f1-R をさまざまな制限酵素で消化後、サブクローンを作製し、DNA シークエンシングを行った。上記により、本研究では、*phbR_{ps}* 遺伝子下流域の 4.2 kb *EcoRV-SphI* 領域の塩基配列を決定した (accession no. LC019127 in EMBL, GenBank and DDBJ)。また、*phbF_{ps}* 遺伝子の上流域のクローニングによって、*phbF_{ps}* 遺伝子の上流域は PHA 生合成に関連がないことが明らかとなった (永井、未発表)。以上より、*Pseudomonas* sp. 61-3 の *pha* および *phb* locus 上のすべての遺伝子が同定された (Fig. 2-1)。

phbP_{ps} 遺伝子は 192 アミノ酸残基からなる推定分子量 20.4 kDa のタンパク質を、*phbF_{ps}* 遺伝子は 177 アミノ酸残基からなる推定分子量約 19.6 kDa のタンパク質をコードしていると考えられた。*PhbP_{ps}* は、*Azotobacter* sp. FA8 の *PhaP_{As}* と 57%¹⁴⁾、*A. vinelandii* AvOP の *PhbP_{Av}*⁷⁾ と 54%の相同性を示し、PHA 顆粒の安定性に関わる phasin タンパク質であると予想された。*PhbF_{ps}* は、*Azotobacter* sp. FA8 の *PhaF_{As}*¹⁴⁾ と 69%、*A. vinelandii* AvOP の *PhbP_{Av}*⁷⁾ と 68%の相同性を示し、さらには phasin 遺伝子の転写を抑制する調節タンパク質と予想されている *P. denitrificans* の *PhaR_{pd}*³⁾ と 37.5%、*R. eutropah* の *PhaR_{re}*^{15, 16)} と 56%の相同性を示した。また、Pfam¹⁷⁾によるドメイン解析の結果、*PhbF_{ps}* は、PHB/PHA accumulation regulator DNA-binding domain (amino acid positions 10 to 73)、PHB accumulation regulatory domain (amino acid positions 75 to 114) および PHB accumulation regulatory domain (amino acid positions 116 to 154) の3つのドメインからなることがわかった。以上より、*PhbF_{ps}* は、*phbP_{ps}* 遺伝子の発現を抑制する調節タンパク質であると予想された。また、コンピューター解析の結果、*phbP_{ps}* 遺伝子上流に *phbP_{ps}* 遺伝子および *phbR_{ps}* 遺伝子と逆向きに存在する ORF を見いだした。この ORF は、2439 bp、812 アミノ酸残基からなる推定分子量 90.2 kDa のタンパク質をコードすると予想された。また、この ORF の相同性検索を行ったところ、*Pseudomonas* sp. GM48 の推定 P(3HA)重合酵素 (accession no. WP_007988013) と 92%、*Pseudomonas putida* の推定 P(3HA)重合酵素 (accession no. WP_033040191) と 87%、*A. vinelandii* DJ の推定 P(3HB)分解酵素と 59%の相同性を示した。しかしながら、これらはゲノムプロジェクトの配列から推定されているにすぎない。この ORF の上流域には、推定 SD 配列が存在し、コンピューター解析によって推定プロモーター配列が見いだされた。ORF のドメイン解析を行ったところ、 α/β ヒドローラーゼドメインを有することが明らかとなり (Fig. 2-2)、この ORF は PHA 重合酵素あるいは菌体内 PHA 分解酵素ではないかと予想された。同様の遺伝子クラスターを有する *A. vinelandii* UW136 およびその他の PHA 生合成細菌の遺伝子クラスター上

には、このような ORF は存在しないことから、トランスポゾンにより挿入された可能性も考えられた。しかしながら、この ORF の周辺領域には、トランスポゾンに特徴的な反復配列を有していないことから、トランスポゾンによる転移ではないと考えられた。また、*phb* locus 上に存在していることから、PHA（特に P(3HB)) の生合成に関与している可能性が示唆された。

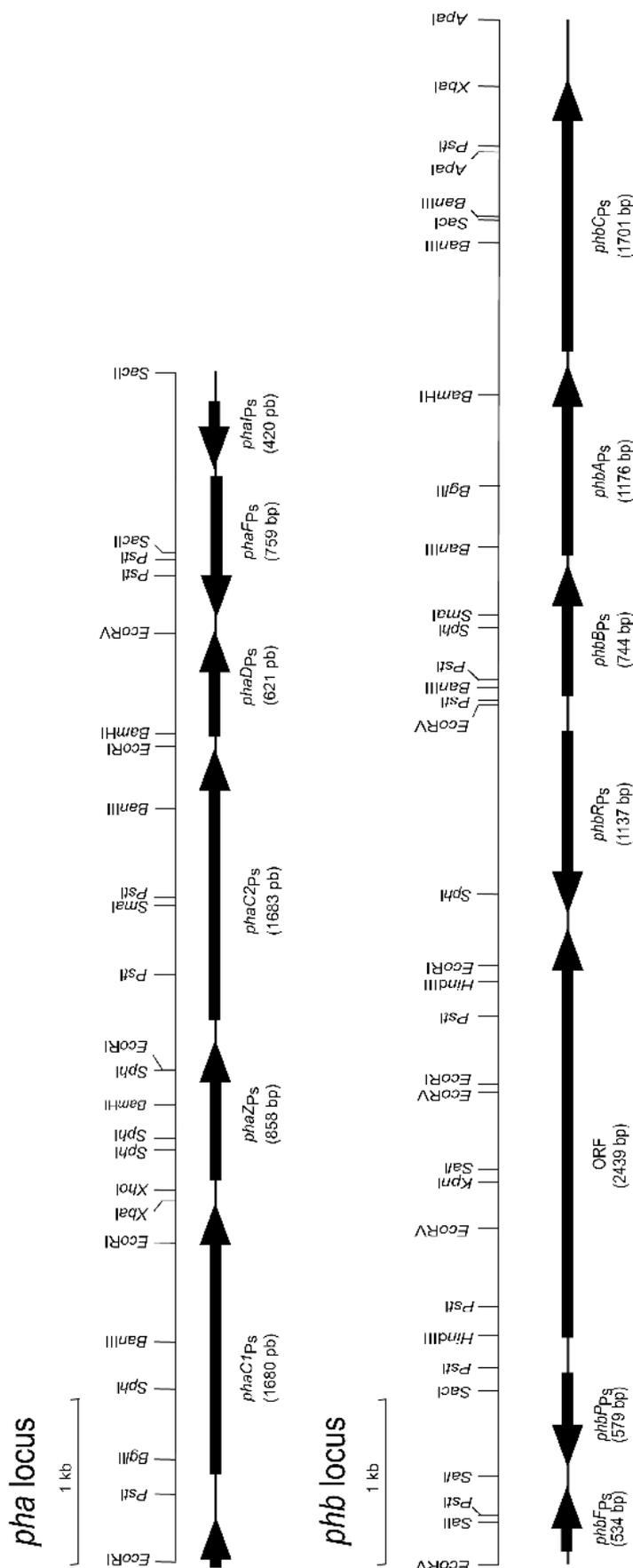


Fig. 2-1 Organization of *pha* and *phb* loci in *Pseudomonas* sp. 61-3.

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

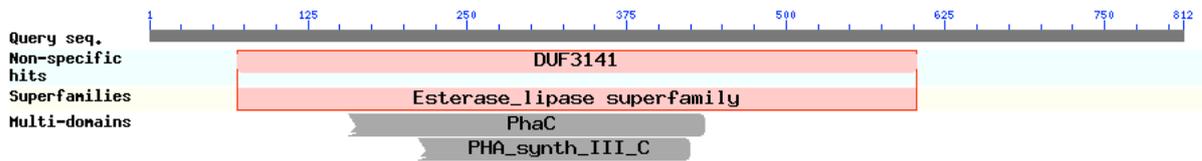


Fig. 2-2 機能不明 ORF のドメイン解析

2-3-2 PHA のモノマー組成と PHA 顆粒結合タンパク質の局在性

Pseudomonas sp. 61-3 は P(3HB) と P(3HB-co-3HA) の 2 種類の PHA を合成し、それぞれの PHA 顆粒には特異的に結合する顆粒結合タンパク質 (GAP) が存在する。しかしながら、これらの GAP が何に起因して PHA 顆粒に結合しているかについては、明らかになっていない。そこで、さまざまなモノマー組成からなる共重合 PHA を合成する *Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株を作製し、PHA のモノマー組成比と GAP の局在性について検討した。まず、さまざまなモノマー組成比を有する共重合 PHA を組換え株に合成させ、菌体破碎およびスクロース密度勾配を行い、PHA 顆粒を回収した。その結果、3HB 分率が 66 mol% 以下の P(3HB-co-3HA) 顆粒は、スクロース濃度が 0-1.0 M の境界で、そして、3HB 分率が 87 mol% 以上の P(3HB-co-3HA) 顆粒は、1.33-1.67 M の境界で確認された。GAP の分離は SDS-PAGE にて行った (Fig. 2-3)。N 末端アミノ酸配列あるいはウエスタンブロット解析により、60-70 kDa に PHB 重合酵素 (PhbC_{ps}) および PHA 重合酵素 1 (PhaC1_{ps}) を確認した。一方で、PHA 重合酵素 2 (PhaC2_{ps}) に関しては、検出されなかった。これは、これまでの松本らの結果と同様であり、PhaC1_{ps} と PhaC2_{ps} では、PhaC1_{ps} が *Pseudomonas* sp. 61-3 の主要な PHA 重合酵素であることを示唆している⁹⁾。合成された PHA のモノマー組成については、ガスクロマトグラフィーにより分析し、モノマー組成比と検出された GAP については Table 2-20 に示した。その結果、*Pseudomonas* sp. AC1-TnK 以外の組換え株の PHA 顆粒で PhaC1_{ps} が検出され、*Pseudomonas* sp. AC1-TnK の PHA 顆粒では、PhbC_{ps} が弱く検出された。SDS-PAGE を行った結果、GA18 (PhaI_{ps}) および GA36 (PhaF_{ps}) は、*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)、*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJASc22、*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJKSc46-*pha* および *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJKSc54-*phab* の PHA 顆粒で検出されたが、*Pseudomonas* sp. AC1-TnK および *Pseudomonas* sp. BCG-TcGm/pJKSc54-*phab* からは検出されなかった。また、本研究で同定した GA24 (PhbP_{ps}) は、*Pseudomonas* sp. 61-3

(*phbC::tet*)/pJKSc54-*phab*、*Pseudomonas* sp. AC1-TnK および *Pseudomonas* sp. BCG-TcGm/pJKSc54-*phab* の PHA 顆粒から検出された。つまり、PhbP_{ps} は、3HB 分率が 87 mol%以上の P(3HB-*co*-3HA)顆粒に結合し、3HB 分率が少なくとも 66 mol%以下では結合しなかった。一方、PhaI_{ps} および PhaF_{ps} は、炭素数が 6~12 の 3HA 分率が 13 mol%以上の P(3HB-*co*-3HA)顆粒に結合していた。また、*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJKSc54-*phab* および *Pseudomonas* sp. BCG-TcGm/pJKSc54-*phab* においては、*phbC_{ps}* 遺伝子は破壊されているにもかかわらず、これらの菌株の P(3HB-*co*-3HA)顆粒に PhbP_{ps} は結合していた。したがって、PhbP_{ps} は、PHB 重合酵素との相互作用ではなく、共重合ポリエステルの 3HB ユニットを認識して結合していると考えられた。牛丸らは、*Aeromonas caviae* において、phasin タンパク質の PhaP_{Ac} が PHA 重合酵素 (PhaC_{Ac}) を活性化すると報告している⁹⁾。また、一方で、*A. caviae* の PhaP_{Ac} は、*R. eutropha* の PHA 重合酵素 (PhaC_{Re}) を活性化しないと報告している。これは、*R. eutropha* の PhaI_{Re} と PhaP_{Ac} がアミノ酸レベルで相同性が低い(13%)からであると考えられ、*Pseudomonas* sp. 61-3 の PhbP_{ps} も同様に PhaP_{Ac} との相同性が低い(23%)。これらの結果からも、*R. eutropha* や *Pseudomonas* sp. 61-3 においては、*A. caviae* とは異なり、phasin タンパク質と PHA 重合酵素は相互作用を示さないと考えられる。

第一章の序論でも述べた通り、*in vivo* において、PHA はアモルファスの状態で存在し、PHA 顆粒は膜に覆われている。この膜構造について、いくつかのモデルが提唱されている。まず1つ目のモデルは、PHA 顆粒が、PHA 重合酵素や菌体内 PHA 分解酵素、phasin タンパク質などを含むリン脂質の膜によって覆われているというものである^{1,18)}。2つ目のモデルは、リン脂質の単層上に PHA 顆粒結合タンパク質が存在しているというものであり、3つ目のモデルは、リン脂質二重膜の膜上に PHA 顆粒結合タンパク質が存在しているというものである^{19,20)}。*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 顆粒においては、どのような膜構造が形成されているかについては明らかにされていないが、PhbP_{ps} (GA24)、PhaI_{ps} (GA18) および PhaF_{ps} (GA36) がそれぞれ特異的に P(3HB)と P(3HB-*co*-3HA)顆粒に結合することがわかっている⁶⁾。また、本研究において、PHA 顆粒結合タンパク質はポリエステル鎖のモノマー組成比を認識して結合していることが示唆された。これまでに PHA のモノマー組成の変化によって、PHA 顆粒の膜構造が変化することが報告されている²¹⁾。したがって、P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルのモノマー組成比の変化により、PHA 顆粒を覆っている膜構造が変化し、それによって PhbP_{ps}、PhaI_{ps} および PhaF_{ps} タンパク質が特異的に結合している可能性もある。

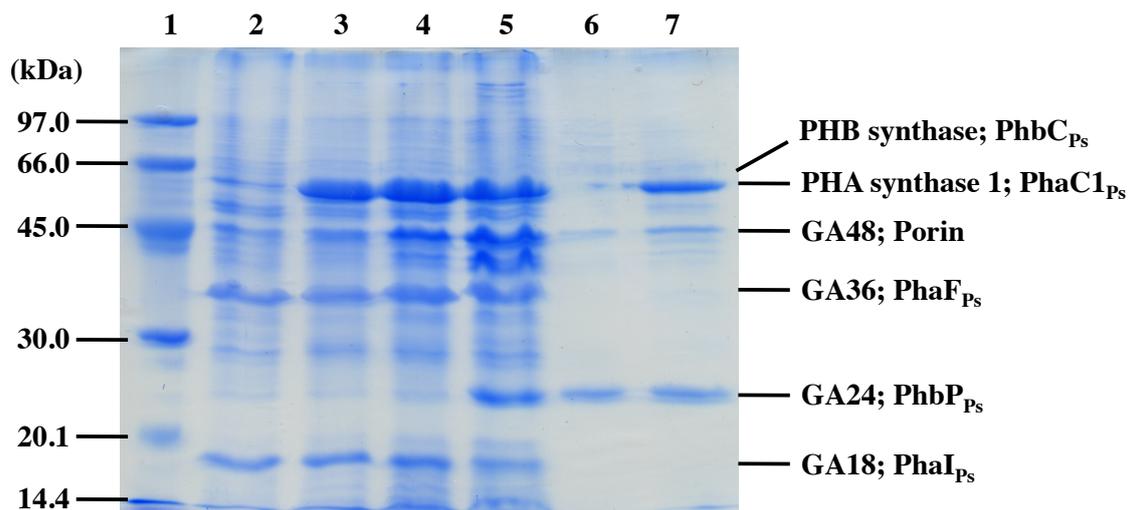


Fig. 2-3 SDS-PAGE analysis of native PHA granules isolated from the recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*); lane 3, *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJASc22; lane 4, *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJKSc46-*pha*; lane 5, *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJKSc54-*phab*; lane 6, *Pseudomonas* sp. AC1-TnK; lane 7, *Pseudomonas* sp. BCG-TcGm/pJKSc54-*phab*

Table 2-20 Relationship of the monomer composition of PHA accumulated by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3 and the granule-associated proteins

Strain	plasmid	PHA composition (mol%)		Molecular weight of granule-associated protein
		$\frac{3HB}{(C_4)}$	$\frac{3HA}{(C_6-C_{12})}$	
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3 (<i>phbC::tet</i>)	none	30	70	62 kDa 48 kDa 36 kDa 18 kDa
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3 (<i>phbC::tet</i>)	pJASc22	49	51	62 kDa 48 kDa 36 kDa 18 kDa
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3 (<i>phbC::tet</i>)	pJKSc46- <i>pha</i>	66	34	62 kDa 48 kDa 36 kDa 18 kDa
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3 (<i>phbC::tet</i>)	pJKSc54- <i>phab</i>	87	13	62 kDa 48 kDa 36 kDa 24 kDa 18 kDa
<i>Pseudomonas</i> sp. AC1-TnK	none	95	5	(69 kDa) (48 kDa) 24 kDa
<i>Pseudomonas</i> sp. BCG-TcGm	pJKSc54- <i>phab</i>	99	1	62 kDa (48 kDa) 24 kDa

Cells were cultivated at 28°C for 48 h or 72 h (*Pseudomonas* sp. AC1-TnK) in MS medium containing 2% (wt/vol) glucose as the sole carbon source. Minor bands are indicated in parentheses. 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HA, medium-chain-length 3-hydroxyalkanoate units (C₆-C₁₂)

2-4 小括

Pseudomonas sp. 61-3 は、P(3HB)ホモポリマーと P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの2種類の PHA を菌体内にそれぞれ別々の顆粒として蓄積する^{22,24)}。これまでに、*Pseudomonas* sp. 61-3 の P(3HB)と P(3HB-co-3HA)の生合成に関わる遺伝子がクローニングされ、同定されている^{6,8,9)}。P(3HB)と P(3HB-co-3HA)顆粒には、それぞれ特異的に結合するタンパク質 (GAP) が存在し、PHB および PHA 重合酵素 (PhbC_{Ps} および PhaC_{Ps}) と PhaI_{Ps} および PhaF_{Ps} が同定されている⁹⁾。本章では、これまで同定されていない P(3HB)顆粒に結合するタンパク質 (GA24) の遺伝子クローニングを行った。また、これらの GAP が何に起因して PHA 顆粒に結合するかについては明らかになっていない。そこで、さまざまなモノマー組成からなる共重合 PHA を合成する *Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株を作製し、PHA のモノマー組成比と GAP の局在性について検討した。

GA24 遺伝子のクローニングを行い、*phbP*_{Ps} と命名・同定した。さらに、この *phbP*_{Ps} 遺伝子をプローブとして、本菌のゲノム DNA ライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションを行い、*phbP*_{Ps} 遺伝子の周辺領域をクローニングした結果、*phbP*_{Ps} 遺伝子の下流に *phbF*_{Ps} 遺伝子を発見した。*phbP*_{Ps} 遺伝子の推定翻訳産物は、192 アミノ酸残基からなる推定分子量 20.4 kDa のタンパク質 (GA24) であり、*Azotobacter* sp. FA8 の PhaP_{As} と 57%¹⁴⁾、*A. vinelandii* AvOP の PhbP_{Av} と 54%⁷⁾の相同性を示し、P(3HB)や P(3HB-co-3HA)顆粒の安定性に関わる phasin タンパク質であると予想された。一方、*phbF*_{Ps} 遺伝子の推定翻訳産物は、178 アミノ酸残基からなる推定分子量 19.6 kDa であり、*Azotobacter* sp. FA8 の PhaF_{As} と 69%¹⁴⁾、*A. vinelandii* AvOP の PhbP_{Av} と 68%⁷⁾の相同性を示した。さらに、phasin 遺伝子の転写を調節するタンパク質であると予想されている *P. denitrificans* の PhaR_{Pd} と 37.5%、*R. eutropha* の PhaR_{Re} と 56%の相同性を示したことと^{3,15,16)}、ドメイン解析の結果から、PhbF_{Ps} は *phbP*_{Ps} 遺伝子の発現を抑制する調節タンパク質として機能していると予想された。

次に、P(3HB)や P(3HB-co-3HA)顆粒に結合するタンパク質 (PhbP_{Ps}、PhaI_{Ps} および PhaF_{Ps}) の局在性とポリエステルのモノマー組成比との関係について検討した。Figure 2-4 にポリエステルのモノマー組成比と GAP の局在性に関するモデルを示した。PhbP_{Ps} (GA24) は、3HB 分率が 87 mol%以上の P(3HB-co-3HA)顆粒から検出され、一方、PhaI_{Ps} (GA18) および PhaF_{Ps} (GA36) は、炭素数が 6~12 の 3HA 分率が 13 mol%以上の P(3HB-co-3HA)顆粒から検出された (Table 2-20 および Fig. 2-3)。また、PhbP_{Ps} は、*phbC*_{Ps} 遺伝子破壊株におい

でも検出され (Fig. 2-4 D)、PhaI_{ps} および PhaF_{ps} は、*phbC_{ps}* 遺伝子のみを破壊した株において検出されたが (Fig. 2-4 A and B)、一方で、*phaC1_{ps}* 遺伝子導入株においても検出されていないことから (Fig. 2-4 D)、これらの PHA 顆粒結合タンパク質は、PHB あるいは PHA 重合酵素との相互作用により PHA 顆粒に局在しているのではなく、PHA のポリエステル鎖を直接認識し、モノマー組成比に応じて結合していると予想した。

PHB あるいは PHA 重合酵素、菌体内 PHB あるいは PHA 分解酵素、phasin タンパク質および調節タンパク質は PHA 顆粒結合タンパク質として知られ、これらは、PHA 生合成や分解において非常に重要な役割を果たしている。したがって、本研究のように PHA 顆粒結合タンパク質の同定および機能解析、そしてその性質について検討することは、丈夫で実用的な PHA を効率的に生合成させるための重要な知見となりうる。

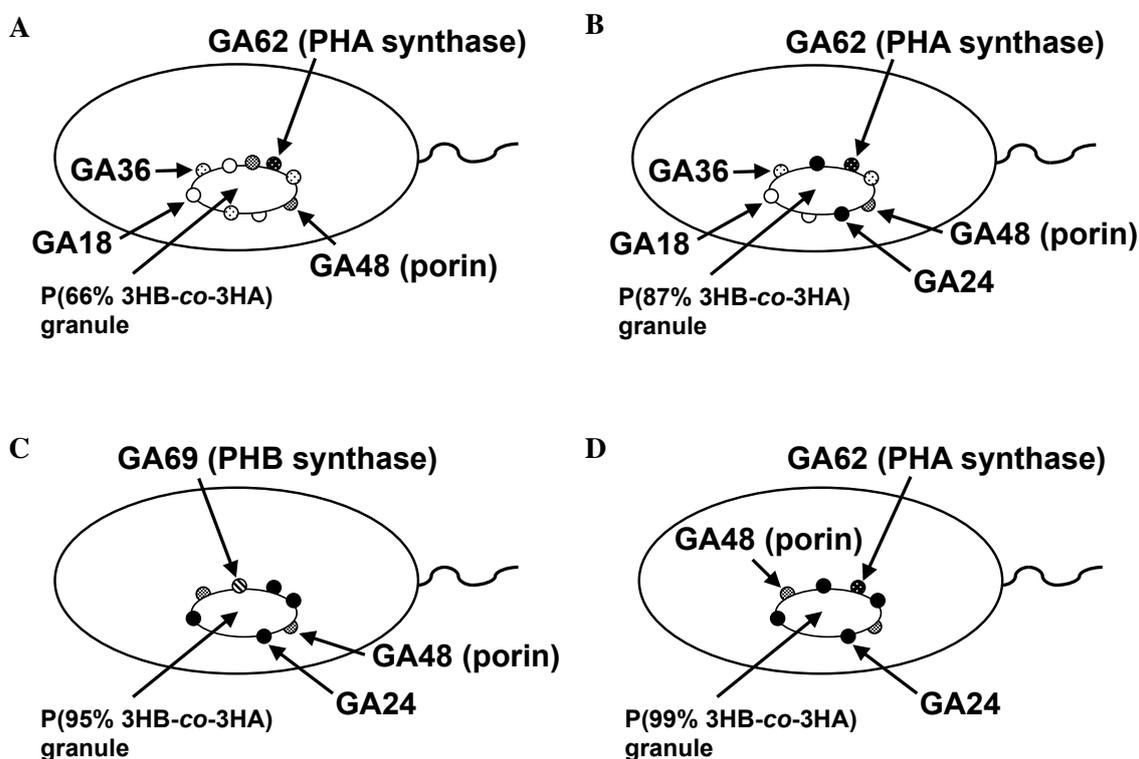


Fig. 2-4 The localization model of the proteins associated with polyester granules accumulated in (A) *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJKSc46-*pha*, (B) *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)/pJKSc54-*phab*, (C) *Pseudomonas* sp. AC1-TnK and (D) *Pseudomonas* sp. BCG-TcGm/pJKSc54-*phab*.

1. Griebel, R., Smith, Z. and Merrick, J.M. (1968) Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry*, **7**, 3676-3681
2. Gerngross, T.U., Reilly, P., Stubbe, J., Sinskey, A.J and Peoples, O.P. (1993) Immunocytochemical analysis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: Localization of the synthase enzyme at the surface of PHB granules. *J. Bacteriol.*, **175**, 5289-5293
3. Maehara, A., Ueda, S., Nakano, H. and Yamane, T. (1999) Analysis of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the *pha* locus of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bacteriol.*, **181**, 2914-2921
4. Prieto, M.A., Bühler, B., Jung, K., Witholt, B. and Kessler, B. (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J. Bacteriol.*, **181**, 858–868
5. Ushimaru, K., Motoda, Y. Numata, K. and Tsuge, T. (2014) Phasin proteins activate *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase but not *Ralstonia eutropha* PHA synthase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 2867-2873
6. Matsumoto, K., Matsusaki, H., Taguchi, K., Seki, M. and Doi, Y. (2002) Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, **3**, 787-792
7. Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzman, J., Servin-Conzalez, L. and Espin, G. (2002) Expression of *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhaR. *J. Bacteriol.*, **184**, 5672–5677

8. 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
9. 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
10. Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, **1**, 784-791
11. Alexeyev, M.F. and Shokolenko, I.N. (1995) Mini-Tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of Gram-negative bacteria. *Gene*, **160**, 59-62
12. Allen, L.N. and Hanson, R.S. (1985) Construction of broad-host-range cosmid cloning vectors: identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol. *J. Bacteriol.*, **161**, 955-962
13. Matsusaki, H., Abe, H., Taguchi, K., Fukui, T. and Doi, Y. (2000) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas* sp. 61-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 401-409
14. Pettinari, M.J., Chaneton, L., Vazques, G., Steinbüchel, A. and Méndez, BS. (2003) Insertion sequence-like elements associated with putative polyhydroxybutyrate regulatory genes in *Azotobacter* sp. FA8. *Plasmid*, **50**, 36-44
15. Pötter, M., Madkour, M.H., Mayer, F. and Steinbüchel, A. (2002) Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, **148**, 2413-2426
16. Pötter, M., Müller, H. and Steinbüchel, A. (2005) Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, **151**, 825-833

17. <http://pfam.xfam.org/>
18. Pieper-Fürst, U., Madkour, M.H., Mayer, F. and Steinbüchel, A. (1994) Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. *J. Bacteriol.*, **176**, 4328-4337
19. Stuart, E.S., Fuller, R.C. and Lenz, R.W. (1995) The ordered macromolecular surface of polyester inclusion bodies in *Pseudomonas oleovorans*. *Can. J. Microbiol.*, **41**, 84-93
20. Mayer, F. and Hoppert, M. (1997) Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer. *J. Basic Microbiol.*, **37**, 45-52
21. Mayer, F., Madkour, M.H., Pieper-Fürst, U., Wieczorek, R. and Steinbüchel, A. (1996) Electron microscopic observations on the macromolecular organization of the boundary layer of bacterial PHA inclusion bodies. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **42**, 445-455
22. Kato, M., Bao, H.J., Kang, C.K., Fukui, T. and Doi, Y. (1996) Production of a novel 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 363-370
23. Kato, M., Fukui, T. and Doi, Y. (1996) Biosynthesis of polyester blends by *Pseudomonas* sp. 61-3 from alkanolic acids. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 515-520
24. Fukui, T., Kato, M., Matsusaki, H., Iwata, T. and Doi, Y. (1998) Morphological and ¹³C-nuclear magnetic resonance studies for polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas* sp. 61-3. *FEMS Microbiol. Lett.*, **164**, 219-225

第三章

Pseudomonas sp. 61-3 のポリヒドロキシ

アルカン酸生合成遺伝子クラスター上に存在す
る機能不明遺伝子

3-1 緒言

Pseudomonas sp. 61-3 は、P(3HB)ホモポリマーと P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの2種類の PHA を菌体内に合成し、それぞれの PHA 生合成に関わる遺伝子がクローニングされ、同定されている¹⁻³⁾。第二章で述べたように、*A. vinelandii* UW136 では、*phbR* 遺伝子のすぐ下流に *phbP* 遺伝子が存在するが、*Pseudomonas* sp. 61-3 においては、この間が約 3 kb 離れていることが明らかとなり、*phbP_{ps}* 遺伝子上流に *phbP_{ps}* 遺伝子および *phbR_{ps}* 遺伝子と逆向きに存在する ORF を新たに見いだした。この ORF は、2439 bp、812 アミノ酸残基からなる推定分子量 90.2 kDa のタンパク質をコードすると予想され、上流域には、推定 SD 配列が存在し、推定プロモーター配列も見いだされている。この ORF は、本菌の *phb* locus 上に存在することから、PHA 生合成、特に P(3HB)の生合成に関与する可能性がある。また、ドメイン解析を行ったところ、 α/β ヒドロラーゼドメインを有することが明らかとなり、この ORF は PHA 重合酵素あるいは菌体内 PHA 分解酵素ではないかと予想された。そこで、本章では、この ORF の機能を解析するために、ORF 導入株および ORF 破壊株を作製し、PHA 蓄積率とモノマー組成について調べた。また、菌体内 PHA 分解酵素活性について調べるために、PHA 分解酵素をもたない非 PHA 生産菌である大腸菌を用いた *in vivo* アッセイを行った。

3-2 実験操作

3-2-1 使用菌株および使用プラスミド

本研究で使用した菌株およびプラスミドを Table 3-1 に示した。

Table 3-1 使用菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3	Wild type	JCM 10015, 1)
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3 (<i>phbC::tet</i>)	Inactivation of chromosomal <i>phbC_{PS}</i> by integration of Tc ^r ; <i>phbC_{PS}</i> -negative mutant	1)
<i>Pseudomonas</i> sp. ORF-TnK	ORF negative mutant, ORF:: <i>kan</i> (Tn10), Km ^r	This study
<i>Pseudomonas putida</i> GPp104	PHA-negative mutant of KT2440	4)
<i>Ralstonia eutropha</i> PHB-4	PHA-negative mutant of H16	DSM 541, 5)
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>deoR endoA1 gyrA96 hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁺</i>) <i>relA1 supE thi-1 Δ(lacZYA-argFVI69)</i> ϕ 80 Δ lacZ Δ M15F λ	Clontech
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB)/F⁺[<i>traD36 proAB⁺ lacF^r</i> lacZΔM15]</i>	Novagen
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA</i> and <i>tra</i> genes of plasmid RP4 integrated into the chromosome; auxotrophic for proline and thiamine	6)
<i>E. coli</i> S17-1 (<i>Apir</i>)	π protein encoded by R6K integrated into chromosome	7)
plasmids		
pBluescript II KS ⁺	Ap ^r <i>lacPOZ</i> T7 and T3 promoter	Stratagene
pBSL180	Ap ^r , Km ^r , R6K replicon, suicide, <i>lacI^r</i> , <i>tnp</i> (Tn10), <i>mob⁺</i> , IS10	7)
pBBR1MCS-5	Gm ^r , broad host range, <i>lac POZ'</i>	8)
pBBR1MCS-2	Km ^r , broad host range, <i>lacPOZ'</i>	8)
pT7Blue T-vector	Ap ^r , <i>lacPOZ</i>	Novagen
pGEM ⁺ - <i>phbCAB</i>	pGEM-T derivative; <i>phb_{re}</i> promoter, <i>phbC_{re}</i> , <i>phbA_{re}</i> , <i>phbB_{re}</i>	9)
pRGmASc26-ORF	pBBR1MCS-5 derivative; containing ORF	This study
pRK mASc24-ORF	Km ^r , pBBR1MCS-2 derivative; containing ORF	This study

3-2-2 機能不明 ORF の転写の確認

新たに発見した機能不明 ORF が実際に転写されているかについて調べるために、LB 培地および MS 培地で培養した *Pseudomonas* sp. 61-3 より、total RNA を抽出し、RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) を行った。RNA 抽出のためには、一定の生菌数から RNA を抽出する必要があるため、まずは、*Pseudomonas* sp. 61-3 の生菌数を調べ、検量線を作成した。RNA の抽出には、Qiagen の RNAprotect Bacteria Reagent および RNeasy RNA purification キットを用い、DNaseI 処理を同時に行った。RNA 抽出後、その RNA を鋳型として、PrimeScript II High Fidelity RT-PCR Kit (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た (Tables 3-2, 3-3, 3-4, 3-5 and 3-6)。次に、cDNA を鋳型として、PCR を行い、目的遺伝子の mRNA への転写を調べた (Tables 3-7, 3-8 and 3-9)。

・ 操作

<変性・アニーリング>

Table 3-2 使用プライマー

Primer	Sequence
phb-ORF1-r1	5'-TCATTGAGGCTTTGGACCTTTTGTCTTT-3'

Table 3-3 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
dNTP Mixture	2	10 mM each
phb-ORF1-r1 (10 μM)	0.4	2.5 μM
Template RNA		2 μg
RNase free water	up to 20 μL	

※ ネガティブコントロール作製のために、反応液量を通常のプロトコール (10 μL) の 2 倍量で調製した。

Table 3-4 反応条件

Temperature	Time
65°C	5 min
4°C	∞

<逆転写反応>

Table 3-5 反応液組成

Components	Sample (μL)	Negative control (μL)
変性・アニーリング済み反応液	10	10
5 × PrimeScript II Buffer	4	4
PrimeScript II RT Enzyme Mix	1	-
RNase free water	up to 20 μL	up to 20 μL

Table 3-6 反応条件

Temperature	Time
42°C	15~30 min
95°C	5 min
4°C	∞

<PCR>

Table 3-7 使用プライマー

Primer	Sequence
phb-ORF1-f1(ATG)	5'-ATGGGCCAGGAAGATATTATTGCATCGCAA-3'
phb-ORF1-r1(TGA)	5'-TCATTGAGGCTTTGGACCTTTTGTCCCTTT-3'

Table 3-8 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
10 × PCR Buffer II	5	1 ×
dNTP Mixture	2	400 μM
phb-ORF1-f1(ATG) (10 μM)	0.25	0.2 μM
phb-ORF1-r1(TGA) (10 μM)	0.25	0.2 μM
TaKaRa Ex Taq HS	0.5	
逆転写反応液	5	
滅菌水	up to 50	

Table 3-9 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	2 min
Denature	94°C	1 min
Anneal	52°C	1 min
Extend	72°C	3 min (to step 2 × 27)
Cool	4°C	∞

3-2-3 機能不明 ORF 導入株の作製

機能不明 ORF の重合活性について調べるために、PHA 合成能欠損株である *Pseudomonas putida* GPp104、*Ralstonia eutropha* PHB-4 および *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*) に ORF を導入した組換え株を作製することにした。ORF の推定プロモーター領域から終始コドンまでを含むように設計した Table 3-10 のプライマーを用い、*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA を鋳型として、PCR を行った (Tables 3-11 and 3-12)。PCR で増幅した 2.6-kb の PCR 産物を *Apa*I および *Sac*I で消化し、pBluscript II KS⁺ の *Apa*I および *Sac*I 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、プラスミド pBSASc26-ORF と命名した。さらに、pBSASc26-ORF から 2.6-kb *Apa*I-*Sac*I 断片を切り出し、pBBR1MCS-5 の *Apa*I および *Sac*I 部位にクローニングしたプラスミド pRGmASc26-ORF を構築した。この pRGmASc26-ORF で *E. coli* S17-1 を形質転換し、*E. coli* S17-1 を介した接合伝達により、PHA 合成能欠損株に導入した組換え株を作製した。これらの組換え株の PHA 蓄積率およびモノマー組成は、ガスクロマトグラフィーにより調べた。

Table 3-10 使用プライマー

Primer	Sequence
phb-ORF1-f3 (<i>Apa</i> I)	5'-CCGGGCCC ^{a)} GTTAGCCTTGATATTGCAGTGC-3'
phb-ORF1-r3 (<i>Sac</i> I)	5'-CGAGCTC ^{b)} GTCATTGAGGCTTTGGACCTTTT-3'

^{a)} *Apa*I recognition site, ^{b)} *Sac*I recognition site

Table 3-11 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
2 \times PrimeSTAR GC Buffer (Mg^{2+} plus)	25	1 \times
dNTP Mix	4	0.2 mM each
phb-ORF1-f3 (<i>ApaI</i>) (10 μM)	1.5	0.3 μM
phb-ORF1-r3 (<i>SacI</i>) (10 μM)	1.5	0.3 μM
Template DNA	x	<100 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 units/50 μL
滅菌水	up to 50	

Table 3-12 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	98°C	1 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	68°C	3 min (to step 2 \times 30)
Cool	4°C	∞

- ・ 使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC buffer (TaKaRa)

3-2-4 機能不明 ORF 破壊株の作製

PHA 重合酵素活性について、さらに検討するために、機能不明 ORF 破壊株を作製した。Table 3-13 のプライマーを合成し、pBS-3.7-kb GA24-r3-phbRDS-f1-R (第二章 2-2-3 参照) を鋳型として、PCR を行った (Tables 3-14 and 3-15)。増幅した ORF の内部 1.2-kb の PCR 産物を pT7Blue T-vector にクローニングし、DNA シークエンシングにより、目的の DNA が挿入されていることを確認した。作製したプラスミドを pT7-1.2-kb *Bam*HI-*Sac*II と命名した。次に、pT7-1.2-kb *Bam*HI-*Sac*II から 1.2-kb *Bam*HI-*Sac*II を切り出し、IS 配列をもつ自殺ベクター pBSL180 の *Bam*HI および *Sac*II 部位に挿入した (pSLBS12 と命名)。このプラスミドを *E. coli* S17-1(λ pir)を介した接合伝達法により、*Pseudomonas* sp. 61-3 および *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)の染色体上の ORF を破壊して、*Pseudomonas* sp. ORF-TnK および *Pseudomonas* sp. 61-3 (ORF::*kan*(Tn10), *phbC::tet*)をそれぞれ作製した。宿主の目的遺

伝子が破壊されているかについては、ORF 内部 1.2-kb 領域のプローブを作製し、サザンハイブリダイゼーションによって確認した。これらの組換え株の PHA 蓄積率およびモノマー組成は、ガスクロマトグラフィーにより調べた。

Table 3-13 使用プライマー

Primer	Sequence
phb-ORF1-f2 (BamHI)	5'-CGCGGATCC ^{a)} AGCGCCCTTCACCCGGCCAAC-3'
phb-ORF1-r2 (SacII)	5'-TCCCCGCGG ^{b)} TCGCACAGGCTTGTGTGCTGAT-3'

^{a)} *Bam*HI recognition site, ^{b)} *Sac*II recognition site

Table 3-14 反応組成液

Components	Volume (μ L)	Final Concentration
10 \times Ex Taq Buffer (Mg ²⁺ plus)	5	1 \times
2.5 mM dNTPs	4	0.2 mM each
phb-ORF1-f2 (BamHI) (10 μ M)	2.5	0.5 μ M
phb-ORF1-r2 (SacII) (10 μ M)	2.5	0.5 μ M
Template DNA	x	<500 ng
Ex Taq HS (2.5 units/ μ L)	0.5	1.25 units/50 μ L
滅菌水	up to 50	

Table 3-15 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	2 min
Denature	94°C	1 min
Anneal	70°C	30 sec
Extend	72°C	1.5 min (to step 2 \times 30)
Cool	4°C	∞

・使用酵素

TaKaRa ExTaq HS (TaKaRa)

3-2-5 機能不明 ORF の菌体内 PHA 分解酵素活性

R. eutropha の PHA 生合成遺伝子オペロンを有する pGEM⁺-*phbCAB* と ORF を挿入した pRKmASc-24-ORF の 2 つのプラスミドで菌体内 PHA 分解酵素を持たない大腸菌を形質転換し、ORF の菌体内 PHA 分解酵素活性について調べることを試みた。つまり、大腸菌で PHA を合成・蓄積させた後、ORF を IPTG により誘導発現させ、ORF が PHA 分解酵素であれば、蓄積した PHA の分解がみられるのではないかと考えた。そこで、まず、ORF を *lac* プロモーターの支配下で発現させるために、ORF の native promoter を含まないように設計したプラスミド pRKmASc24-ORF を作製した。Table 3-16 のプライマーを合成し、*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA を鋳型として、PCR を行った (Tables 3-17 and 3-18)。PCR で増幅した 2.4-kb の PCR 産物を *Apal* および *SacI* で消化し、pBBR1MCS-2 ベクターの *Apal* および *SacI* 部位にクローニングした。DNA シークエンシングによって、目的遺伝子が挿入されていることを確認し、プラスミド pRKmASc24-ORF と命名した。この pRKmASc24-ORF およびプラスミド pGEM⁺-*phbCAB* を *E. coli* JM109 に導入した組換え株を作製した。その組換え株の前培養液 1 mL を坂口フラスコ 100 mL (0.5%グルコース含有 LB 培地) に植菌し、37°C で 24 時間、48 時間、72 時間、96 時間本培養を行った。組換え株の PHA 蓄積率およびモノマー組成は、ガスクロマトグラフィーにより調べた。

Table 3-16 使用プライマー

Primer	Sequence
phb-ORF1(SD)-f4 (<i>Apal</i>)	5'-CCGGGCCC ^{a)} ATAACGCCAGGAGATCACCATG-3'
phb-ORF1-r3 (<i>SacI</i>)	5'-CGAGCTC ^{b)} GTCATTGAGGCTTTGGACCTTTT-3'

^{a)} *Apal* recognition site, ^{b)} *SacI* recognition site

Table 3-17 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
5 × PrimeSTAR Buffer (Mg^{2+} plus)	10	1 ×
dNTP Mix	4	0.2 mM each
phb-ORF1(SD)-f4 (ApaI) ($10 \mu\text{M}$)	1.5	$0.3 \mu\text{M}$
phb-ORF1-r3 (SacI) ($10 \mu\text{M}$)	1.5	$0.3 \mu\text{M}$
Template DNA	x	<200 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 units/50 μL
滅菌水	up to 50	

Table 3-18 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	94°C	10 sec
Anneal	70°C	5 sec
Extend	72°C	3 min (to step 2 × 30)
Extend	72°C	10 min
Cool	4°C	∞

- ・使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

3-3 結果および考察

新たに見いだした機能不明 ORF のコンピューター解析の結果、いくつかの推定プロモーター配列が存在していた。そこで、RT-PCR によって、この ORF が実際に転写されているかについて調べた。*Pseudomonas* sp. 61-3 を LB 培地（栄養豊富条件）および MS 培地（窒素制限条件）で 8 時間、12 時間および 24 時間培養後、total RNA を抽出し、RT-PCR を行った。その結果、すべての培地および培養時間で、ORF の転写が確認された (Fig. 3-1)。したがって、この ORF は、遺伝子として何らかの機能を有していると考えられる。また、LB 培地でも MS 培地においても転写が確認されたことから、この ORF は構成的に発現し

ていると予想された。そこで、この ORF の機能解析を進めることにした。

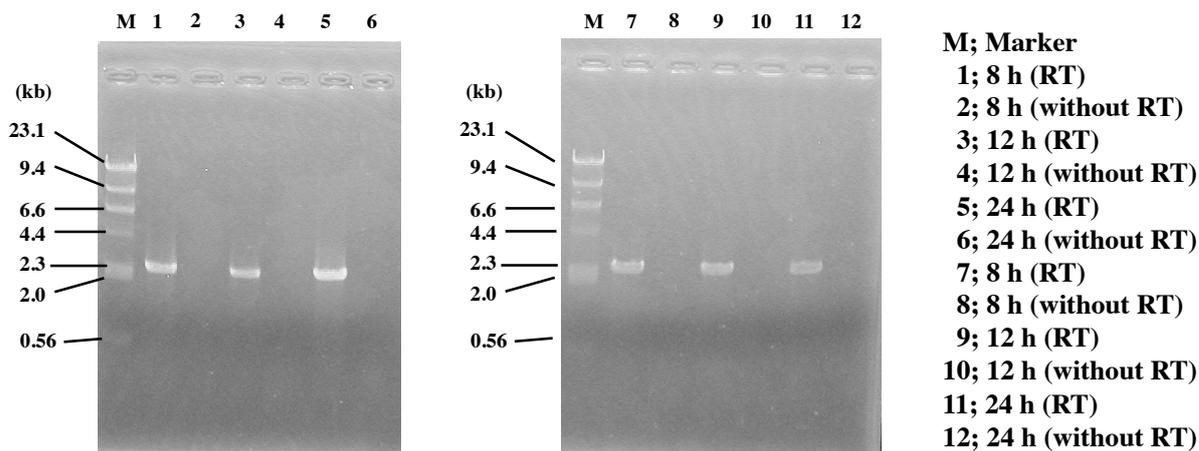


Fig. 3-1 LB 培地 (左) および MS 培地 (右) における RT-PCR の結果

ドメイン解析の結果、 α/β ヒドロラーゼドメインを有することが明らかとなっており、この ORF は PHA 重合酵素あるいは菌体内 PHA 分解酵素ではないかと予想した。そこで、まず PHA 重合酵素活性について検討することにした。まず、ORF の推定プロモーター領域から終始コドンまでを含む領域を pBBR1MCS-5 にクローニングし、プラスミド pRGmASc26-ORF を構築した。そして、PHA 合成能欠損株に pRGmASc26-ORF を導入して、PHA の蓄積率や組成が変化するかについて検討した。PHA 合成能欠損株である *P. putida* GPp104、*R. eutropha* PHB4 および *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*) にそれぞれ ORF を導入した結果を Tables 3-19、3-20 and 3-21 にそれぞれ示した。なお、*P. putida* GPp104 および *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*) は 48 時間、*R. eutropha* PHB4 は 72 時間培養した。*P. putida* GPp104 に pRGmASc26-ORF を導入した場合、pBBR1MCS-5 ベクターのみを導入した株と同様に PHA を合成しなかった (Table 3-19)。*R. eutropha* PHB4 に ORF を導入した場合、pBBR1MCS-5 ベクターのみを導入した株では PHA を全く合成せず、ORF 導入株においては PHA の合成が 1.5 wt% 以下であった (Table 3-20)。*P. putida* GPp104 は、*phbAB* 遺伝子を有していないため、3HB-CoA をほとんど供給することができず、PHB 重合酵素を導入したとしても PHA はほとんど合成されない。しかしながら、*R. eutropha* PHB4 においては、*phbAB* 遺伝子は発現しているため、PHB 重合酵素が存在すれば P(3HB) が合成される。したがって、ORF は弱い PHA 重合活性を有する可能性がある。また、*R. eutropha* はゲンタマイシン耐性の宿主であるが、本研究における ORF の導入において、ゲンタマイシン耐性

の pBBR1MCS-5 ベクターを使用したため、プラスミドが脱落しており、弱い重合活性となっている可能性もある。今後、別の抗生物質耐性のベクターを用いて検討する必要がある。一方、*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)に ORF を導入した場合、ORF 導入株においても、pBBR1MCS-5 ベクターのみを導入した株の PHA 蓄積率とほぼ同じであり、モノマー組成についても変化が見られなかった (Table 3-21)。以上より、ORF を導入しても、PHA の蓄積率やモノマー組成に影響を与えなかった宿主もみられたが、ORF が弱いながらも重合活性を有している可能性も示唆された。

Table 3-19 Accumulation of PHA by recombinant strains of *Pseudomonas putida* GPp104

plasmid	Carbon source	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA composition (mol%)					
				3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')
pBBR1MCS-5	GlcNa	0.7	0	0	0	0	0	0	0
	C12	1.8	0	0	0	0	0	0	0
pRGmASc26-ORF	GlcNa	0.8	0	0	0	0	0	0	0
	C12	1.3	0	0	0	0	0	0	0

The recombinant strains of *P. putida* GPp104 were cultivated at 30°C for 48 h in MS medium containing 2% sodium gluconate or 0.5% sodium dodecanoate, respectively.

3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-*cis*-5-dodecenoate

Table 3-20 Accumulation of PHA by recombinant strains of *Ralstonia eutropha* PHB-4

plasmid	Carbon source	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA composition (mol%)					
				3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')
pBBR1MCS-5	Fru	1.6	0	0	0	0	0	0	0
	C14	1.6	0	0	0	0	0	0	0
pRGmASc26-ORF	Fru	0.8	1.5	100	0	0	0	0	0
	C14	3.3	1.0	100	0	0	0	0	0

The recombinant strains of *R. eutropha* PHB-4 were cultivated at 30°C for 72 h in MS medium containing 2% fructose or 0.5% sodium tetradecanoate, respectively.

3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-*cis*-5-dodecanoate

Table 3-21 Accumulation of PHA by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)

plasmid	Medium	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA composition (mol%)						
				3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')	
pBBR1MCS-5	LB (Glc)	4.2	5	44	4	14	21	12	6	
	MS (Glc)	1.3	16	27	2	13	36	10	11	
	MS (C12)	2.2	58	9	12	41	27	11	0	
pRGmASc26-ORF	LB (Glc)	4.6	8	37	1	13	24	15	10	
	MS (Glc)	1.3	16	22	2	14	37	12	13	
	MS (C12)	2.3	32	6	13	44	27	10	0	

The recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*) were cultivated at 28°C for 48 h in LB medium containing 2% glucose, and MS medium containing 2% glucose or 0.5% sodium dodecanoate, respectively. 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-*cis*-5-dodecenoate

さらに、ORF の PHA 重合活性について検討するために、*Pseudomonas* sp. 61-3 と *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)の染色体上の ORF を破壊して、合成される PHA について調べた。染色体上 ORF の破壊は、不必要なベクター部分の挿入を防ぐために、トランスポゾンによる相対的組換えによって作製した。*Pseudomonas* sp. 61-3 の染色体上 ORF を破壊した *Pseudomonas* sp. ORF-TnK は野生株と比べて、PHA 蓄積率およびモノマー組成に変化は見られなかった (Table 3-22)。また、*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)の染色体上 ORF を破壊した *Pseudomonas* sp. 61-3 (ORF::*kan*(Tn10), *phbC::tet*)においても、*Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*)と比べて蓄積率に変化は見られなかったが、MS 培地で培養した場合、3HB 分率が減少した (Table 3-22)。この結果から、ORF が *phaC1* 遺伝子を活性化する働きをもつ可能性も考えられる。以上の ORF 導入株と ORF 破壊株の結果より、機能不明 ORF は PHA 重合酵素ではないと思われたが、補助的な機能 (活性が非常に弱い PHA 重合酵素である可能性を含む) で PHA 生合成に関わっている可能性も考えられる。

そこで、次に ORF の菌体内 PHA 分解酵素活性について検討することにした。非 PHA 生産菌であり、菌体内 PHA 分解酵素を有さない大腸菌を宿主に用いた。まず、大腸菌で PHA を合成・蓄積させ、その後、ORF を IPTG により誘導発現させることで、ORF が菌体内 PHA 分解酵素であれば、蓄積した PHA の分解がみられると考えた。そこで、ORF を *lac* プロモーターの支配下で発現させるために、ORF の native promoter を含まないように、PCR を行い、得られた 2.4 kb の PCR 産物を pBBR1MCS-2 ベクターにクローニングし、pRKmASc24-ORF を構築した。そして、このプラスミドとともに *R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子オペロンを有する pGEM'-*phbCAB* を *E. coli* JM109 に導入した組換え株を作製し、合成される PHA の蓄積率を調べた。炭素源として、0.5%グルコースを用い、24 時間、48 時間、72 時間および 96 時間培養した。その結果を Table 3-23 に示した。その結果、pGEM'-*phbCAB* とともに pRKmASc24-ORF を導入した株の PHA 蓄積率は、pGEM'-*phbCAB* とともに pBBR1MCS-2 ベクターのみを導入した株とほとんど変わらず、PHA の蓄積率の減少はみられなかった。しかしながら、この系においては、IPTG 誘導後にグルコースを添加しているため、PHB 合成時に ORF が発現していたため、分解活性を確認できなかった可能性もある。今後、培養条件をさらに検討する必要がある。

以上より、本実験では、この ORF の機能を明らかにすることはできなかった。今後、PHA 重合酵素活性や菌体内 PHA 分解酵素活性について、非 PHA 生産菌である大腸菌を宿主にするなどして、新たな *in vivo* での実験系を構築し、さらなる検討を行う必要がある。

例えば、これまでに *phbAB* 遺伝子と ORF を大腸菌に導入した組換え株を作製し、培養を試みているが、PHA は合成されていない。今後、さらなる条件検討や宿主の検討を行う必要がある。また、ORF の翻訳産物を精製し、*in vitro* での PHA 分解試験についても検討する必要がある。この ORF が α/β ヒドロラーゼドメインを有していることから、PHA 重合酵素あるいは菌体内 PHA 分解酵素であると予想しているが、Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (Phyre2)¹⁰⁾ の立体構造の予測 (Fig. 3-2) によると、リパーゼ活性をもつ酵素である可能性が高いと予想されているため、菌体外 PHA 分解酵素である可能性も含めて検討する必要がある。

Table 3-22 Accumulation of PHA by ORF-disruptants

Strain	Cultivation time (h)	Medium	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA composition (mol%)						
					3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')	
61-3 (wild strain)	24	LB (Glc)	4.2	16	95	0	trace	2	1	2	
	48	MS (Glc)	1.9	25	60	0	7	19	6	8	
(<i>phbC::tet</i>)	24	LB (Glc)	3.6	2	26	0	14	33	13	14	
	48	MS (Glc)	1.8	20	52	0	7	19	15	8	
ORF-TnK (ORF:: <i>kan</i> (Tn10))	24	LB (Glc)	3.2	17	96	0	0	2	1	1	
	48	MS (Glc)	1.5	24	59	1	8	19	6	7	
(ORF:: <i>kan</i> (Tn10), <i>phbC::tet</i>)	24	LB (Glc)	3.2	1	47	0	7	29	17	trace	
	48	MS (Glc)	1.4	25	36	3	14	34	11	15	

Cells were cultivated at 28°C for 24 or 48 h in LB medium or MS medium containing 2% glucose, respectively. 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-*cis*-5-dodecenoate

Table 3-23 Accumulation of PHA by recombinant *Escherichia coli* JM109 harboring pGEM⁺-*phbCAB* and pRKmASc24-ORF

plasmid (relevant marker)	Cultivation time (h)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)
pGEM ⁺ - <i>phbCAB</i> and pBBR1MCS-2 (<i>phbCAB</i> _{Re})	24	3.5	17
	48	3.1	23
	72	3.0	22
	96	2.9	24
pGEM ⁺ - <i>phbCAB</i> and pRKmASc24-ORF (<i>phbCAB</i> _{Re} , ORF)	24	3.2	15
	48	2.8	15
	72	2.7	16
	96	2.7	17

Cells were cultivated at 37°C for 24 h, 48 h, 72 h or 96 h in LB medium. IPTG was added to the medium at a concentration of 1 mM at 5 h of cultivation, and a filter-sterilized glucose was added to the medium at a concentration of 0.5% (w/v) after 8 h of cultivation.

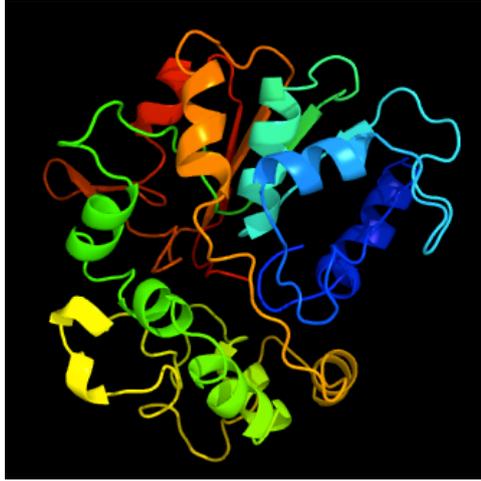


Fig. 3-2 ORF の立体構造予測¹⁰⁾

3-4 小括

これまで、*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 生合成関連遺伝子として、P(3HB-co-3HA)の生合成に関与する *pha* locus と P(3HB)の生合成に関与する *phb* locus がそれぞれ同定されている。*pha* locus については、PHA 生合成に関する遺伝子はすべて明らかになっているが、*phb* locus については、すべての遺伝子は同定されていない。第二章にて、*Pseudomonas* sp. 61-3 の *phb* locus 上の *phbP_{ps}* 遺伝子と *phbR_{ps}* 遺伝子の間が約 3 kb 離れていることが明らかとなり、この領域に新たな機能不明 ORF を見いだした。そこで、本章では、この ORF の機能を明らかにすることを試みた。

まず、この ORF の上流域には、推定 SD 配列が存在し、推定プロモーター配列が見いだされたため、ORF が実際に転写されているのかについて RT-PCR により調べた。その結果、この ORF は、転写されており、遺伝子として何らかの機能を有していると考えられた。さらには、LB 培地（栄養豊富条件）および MS 培地（窒素制限条件）のいずれで培養した場合においても転写が確認され、この ORF は構成的に発現していた。

第二章での ORF のドメイン解析により、この ORF は、 $\alpha\beta$ ヒドrolラーゼドメインを有するため、PHA 重合酵素あるいは菌体内 PHA 分解酵素ではないかと予想し、機能解析を試みた。まず、機能不明 ORF の PHA 重合酵素活性について検討するために、ORF 導入株お

よび ORF 破壊株を作製し、合成される PHA の蓄積率やモノマー組成について調べた。プラスミド pRGmASc26-ORF を構築し、PHA 合成能欠損株である *P. putida* GPp104、*R. eutropha* PHB4 および *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*) に ORF を導入した株を作製した。*R. eutropha* PHB4 の組換え株でわずかに PHA が合成されたものの、他の組換え株においては PHA の合成や蓄積率の向上はみられなかった。次に、*Pseudomonas* sp. 61-3 と *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phbC::tet*) の染色体上の ORF を相同的組換えにより破壊した *Pseudomonas* sp. ORF-TnK および *Pseudomonas* sp. 61-3 (ORF::*kan*(Tn10), *phbC::tet*) を作製し、合成される PHA について調べた。その結果、ORF を破壊しても、PHA 蓄積率とモノマー組成に大きな影響を与えなかった。以上の結果より、機能不明 ORF は PHA 重合酵素ではないとも考えられるが、PHA 生合成における補助的な機能（活性が非常に弱い PHA 重合酵素である可能性を含む）を有している可能性も考えられる。

次に、ORF の菌体内 PHA 分解酵素活性について、菌体内 PHA 分解酵素を有さない大腸菌を宿主として *in vivo* アッセイを行った。プラスミド pRKmASc24-ORF を構築し、pGEM¹-*phbCAB* とともに *E. coli* JM109 に導入し、IPTG 誘導により ORF を発現させることで、PHA 分解酵素活性について検討した。その結果、ORF を導入しても、PHA 蓄積率の減少はみられなかった。

以上より、本実験では、この ORF の機能を明らかにすることはできなかった。今後、PHA 重合酵素活性や菌体内 PHA 分解酵素活性について、新たな *in vivo* での実験系を構築し、さらなる検討を行う必要がある。また、菌体外 PHA 分解酵素である可能性も含めて *in vitro* における PHA 分解試験についても検討する必要がある。

1. 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
2. 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
3. Matsumoto, K., Matsusaki, H., Taguchi, K., Seki, M. and Doi, Y. (2002) Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, **3**, 787-792
4. 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
5. Schlegel, H.G., Lafferty, R. and Krauss, I. (1970) The isolation of mutants not accumulating poly- β -hydroxybutyric acid. *Arch. Microbiol.*, **71**, 283-294
6. Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, **1**, 784-791
7. Alexeyev, M.F. and Shokolenko, I.N. (1995) Mini-Tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of Gram-negative bacteria. *Gene*, **160**, 59-62
8. 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
9. Matsusaki, H., Abe, H., Taguchi, K., Fukui, T. and Doi, Y. (2000) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas* sp. 61-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 401-409

10. <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>

第四章

組換え *Ralstonia eutropha* による PHA 生産

4-1 緒言

Ralstonia eutropha は、増殖が速く、PHA 蓄積能が非常に高い細菌であり、加えて二酸化炭素を固定することのできる化学合成独立栄養細菌である。この *R. eutropha* を宿主として二酸化炭素から実用的な PHA が合成できれば、高度環境調和型 PHA 生産システムを構築できると考えられる。しかしながら、*R. eutropha* は、糖や二酸化炭素を唯一の炭素源とした場合、P(3HB)ホモポリマーしか合成しない。一方、*Pseudomonas* sp. 61-3 は、糖や脂肪酸から P(3HB)ホモポリマーと、炭素数 4~12 の 3HA からなる P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステル^{1,2)}の 2 種類の PHA を合成・蓄積する^{1,2)}。そこで、これまでに、低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子である *Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaC1_{ps}* を *R. eutropha* PHB4 に導入した組換え株が作製された。この組換え株で、脂肪酸を炭素源として培養すると、P(3HB-co-3HA)を合成したが、糖を炭素源として培養すると、P(3HB)ホモポリマーしか合成されなかった³⁾。これは、*R. eutropha* がβ酸化からの 3HA ユニット供給経路は有しているが、脂肪酸合成経路からの 3HA ユニット供給経路は有していないことが原因と考えられる。

そこで、本章では、*lac* プロモーターあるいは、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native プロモーターの支配下で、*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 重合酵素遺伝子 *phaC1*、3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 *phaG* および *R. eutropha* のβ-ケトチオラーゼ遺伝子 *phbA*、アセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子 *phbB* を導入した組換え株を作製した。そして、従属栄養条件下あるいは独立栄養条件下にて培養し、これらの組換え株が合成した PHA の蓄積率とモノマー組成を調べた。

4-2 実験操作

4-2-1 使用菌株および使用プラスミド

以下の菌株およびプラスミドを本研究に用いた (Table 4-1)。

Table 4-1 使用菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>Ralstonia eutropha</i> PHB 4	PHA-negative mutant of H16	DSM 541, 4)
<i>Ralstonia eutropha</i> C-TrnGmHX8	PHA-negative mutant of H16, <i>phbC</i> :: <i>gen</i> , Gm ^r	This study
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>deoR endoA1 gyrA96 hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>relA1 supE thi-1</i> Δ (<i>lacZYA-argFV169</i>) ϕ 80 Δ <i>lacZ</i> Δ M15F λ	Clontech
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)F ⁺ [<i>traD36 proAB⁺ lacFⁿ</i>] <i>lacZ</i> Δ M15]	Novagen
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA</i> and <i>tra</i> genes of plasmid RP4 integrated into the chromosome; auxotrophic for proline and thiamine	5)
plasmids		
pBBR1MCS-2	Km ^r , broad host range, <i>lacPOZ'</i>	6)
pBluescript II KS ⁺	Ap ^r <i>lacPOZ</i> T7 and T3 promoter	Stratagene
pBSL182	Ap ^r , Gm ^r , R6K replicon, suicide, <i>lacFⁿ</i> , <i>tnp</i> (Tn10), Mob ⁺ , IS10	7)
pMD20-Tvector	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pMB1 ori	TaKaRa
pJB49- <i>phb</i>	pJRD215 derivative; <i>phb_{Re}</i> promoter, <i>phaCI_{Ps}</i> , <i>phbAB_{Re}</i>	3)
pRKmHS32	pBBR1MCS-2 derivative; P _{Ps} promoter, <i>phaCI_{Ps}</i> , <i>phaG_{Ps}</i>	8)
pSKB-C1AB	pBluescript II KS ⁺ derivative; <i>lac</i> promoter, <i>phaCI_{Ps}</i> , <i>phbAB_{Re}</i>	This study
pLGm-HX8	pBSL182 derivative containing the 0.8-kb <i>HindIII-XbaI</i> fragment of <i>phbC_{Re}</i>	This study
pBBR1''C1 _{Ps} AB _{Re}	pBBR1MCS-2 derivative; <i>phb_{Re}</i> promoter, <i>phaCI_{Ps}</i> , <i>phbAB_{Re}</i>	9)
pRKmKSc-C1AB	pBBR1MCS-2 derivative; <i>lac</i> promoter, <i>phaCI_{Ps}</i> , <i>phbAB_{Re}</i>	This study
pRKmKSc-C1GAB	pBBR1MCS-2 derivative; <i>lac</i> promoter, <i>phaCI_{Ps}</i> , <i>phaG_{Ps}</i> , <i>phbAB_{Re}</i>	This study
pRKmKSc-C1G	pBBR1MCS-2 derivative; <i>lac</i> promoter, <i>phaCI_{Ps}</i> , <i>phaG_{Ps}</i>	This study
pBSHE9	pBluescript II KS ⁺ derivative; containing <i>phaG</i> of <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3	This study

4-2-2 組換えプラスミドの作製

I. pRKmKSc-C1AB の作製

まず、*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1_{ps}*)、*R. eutropha* の 3HB ユニット供給系酵素遺伝子 (*phbAB_{re}*) を含むプラスミド pJBB49-*phb* を鋳型として、Table 4-2 のプライマーを用いて、PCR を行い (Tables 4-3 and 4-4)、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native プロモーターを除いた DNA 領域を増幅させた。これを *KpnI* および *BamHI* で制限酵素処理した pBluescript II KS⁺ にクローニングし、作製したプラスミドを pBSKB-C1AB と命名した。このプラスミド pBSKB-C1AB を *KpnI* および *SacI* で消化し、得られた 4.1-kb *KpnI-SacI* 断片を pBBR1MCS-2 にクローニングし、pRKmKSc-C1AB を作製した。アガロースゲルからの DNA 抽出には、GENECLEAN KIT (BIO 101) を使用した。また、作製したプラスミドは、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 シークエンシングを行い、目的遺伝子が導入されていることを確認した。

Table 4-2 使用プライマー

Primer	Sequence
phaC1-KpnI(f)	5'-CGGGGTACC ^{a)} CAATGGAGCGTCGTAGATG-3'
phbCAB-r3(BamHI)	5'-CGGGATCC ^{b)} CTGCAGCCTCGCCCCGCGAGGGCCGCGCTGCA-3'

^{a)} *KpnI* recognition site, ^{b)} *BamHI* recognition site

Table 4-3 反応組成液

Components	Volume (μ L)	Final Concentration
5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	10	1 \times
dNTP Mix	4	0.2 mM each
phaC1-KpnI(f) (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
phbCAB-r3(BamHI) (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
Template DNA	x	< 0.01-100 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 units/50 μ L
滅菌水	up to 50	

Table 4-4 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	2 min
Denature	94°C	20 sec
Anneal	60°C	5 sec
Extend	72°C	5 min (to step 2 × 30)
Cool	4°C	∞

- 使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

II. pRKmKSc-C1GAB の作製

まず、pRKmHS32 を鋳型として、Table 4-5 のプライマーを用い、*phaG_{Ps}* 遺伝子部位を PCR にて増幅し、*Hind*III および *Eco*RI で消化した。得られた 0.9-kb *Hind*III-*Eco*RI 断片を pBluescript II KS⁺の *Hind*III および *Eco*RI 部位にクローニングし、作製したプラスミドを pBSHE9 と命名した。次に pBSHE9 の *phaG_{Ps}* 遺伝子部位を PCR にて増幅し (Tables 4-6、4-7 and 4-8)、*Sma*I と *Hind*III で消化した。得られた 0.9-kb *Sma*I-*Hind*III 断片を inverse PCR (Tables 4-9、4-10 and 4-11) によって、*Sma*I および *Hind*III 部位を付与した pRKmKSc-C1AB に挿入した。作製したプラスミドは、TaKaRa LA Taq を用いたコロニーPCR および制限酵素処理によってインサートチェックを行い、DNA シークエンシングを行い、目的遺伝子が導入されていることを確認した。上記のように、*lac* プロモーターの支配下で、*phaC_{1Ps}*、*phaG_{Ps}*、*phbA_{Re}*、*phbB_{Re}* 遺伝子が発現するように設計したプラスミド pRKmKSc-C1GAB を構築した。

Table 4-5 使用プライマー

Primer	Sequence
<i>phaG</i> -SD(<i>Hind</i> III)-f	5'-CCCAAGCTT ^{a)} GCATACCCGCTTGCCAGGAGT-3'
<i>phaG</i> - <i>Eco</i> RI(TGA)-r	5'-CGGAATTC ^{b)} CTCAAATTGCCAATGCATGGTG-3'

^{a)} *Hind*III recognition site, ^{b)} *Eco*RI recognition site

Table 4-6 使用プライマー

Primer	Sequence
phaG - SD(HindIII)-f	5'-CCCAAGCTI ^{a)} GCATACCCGCTTGCCAGGAGT-3'
phaG - SmaI(TGA)-f	5'-TCCCCCGGG ^{b)} TCAAATTGCCAATGCATGGTG-3'

^{a)} *HindIII* recognition site, ^{b)} *SmaI* recognition site

Table 4-7 反応組成液

Components	Volume (μ L)	Final Concentration
5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	10	1 \times
dNTP Mix	4	0.2 mM each
phaG - SD(HindIII)-f (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
phaG - SmaI(TGA)-f (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
Template DNA	x	< 1 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 units/50 μ L
滅菌水	up to 50	

Table 4-8 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	68°C	1 min (to step 2 \times 30)
Cool	4°C	∞

- 使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

Table 4-9 使用プライマー

Primer	Sequence
phaC1-HindIII(TAA)-r2	5'-CCCAAGCTI ^{a)} CTAGACTGCCTACAACCTAAC-3'
phbA(Re)-SD(SmaI)-f	5'-TCCCCCGGG ^{b)} GTTCCCTCCCGTTTCCATTGA-3'

^{a)} *HindIII* recognition site, ^{b)} *SmaI* recognition site

Table 4-10 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
5 × PrimeSTAR Buffer (Mg^{2+} plus)	10	1 ×
dNTP Mix	4	0.2 mM each
phaG - SD(HindIII)-f (10 μM)	1.5	0.3 μM
phaG - SmaI(TGA)-f (10 μM)	1.5	0.3 μM
Template DNA	x	< 1 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 units/50 μL
滅菌水	up to 50	

Table 4-11 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	68°C	9 min (to step 2 × 30)
Cool	4°C	∞

- ・ 使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

III. pRKmKSc-C1G の作製

lac プロモーターの支配下で、*phaCI*_{ps}、*phaG*_{ps} 遺伝子が発現するように設計したプラスミド pRKmKSc-C1G を以下のように構築した。pRKmKSc-C1GAB を *Nde*I、*Sma*I で消化し、T4 DNA polymerase によって平滑化後、セルフラーゲーションを行った。作製したプラスミドは、コロニーPCR および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て目的遺伝子が導入されていることを確認した。

IV. pRKmScK-C1AB の作製

まず、プラスミド pBBR1''C1_{ps}AB_{re} を鋳型として PCR を行い、*Sac*I および *Kpn*I 部位を付与した *phaCI*_{ps}、*phbA*_{re}、*phbB*_{re} を含む断片を得た (Tables 4-12、4-13 and 4-14)。その 4.0-kb 断片を切り出し、dA 付加を行い、pMD20-T vector に挿入した。その後、このプラスミド

を *SacI* および *KpnI* で消化して得られた 4.0-kb *SacI-KpnI* 断片を、pBBR1MCS-2 ベクターの *SacI* および *KpnI* 部位に挿入した。アガロースゲルからの DNA 抽出には、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使用した。また、作製したプラスミドは、EmeraldAmp PCR Master Mix (TaKaRa) を用いたコロニーPCR および制限酵素処理によってインサートチェックを行い、DNA シーケンシングにて目的遺伝子が導入されていることを確認した。上記のように、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子 (*phbCAB* オペロン) の native プロモーターの支配下で、*phaC1_{Ps}*、*phbA_{Re}*、*phbB_{Re}* 遺伝子が発現するように設計したプラスミド pRKmScK-C1AB を構築した。

Table 4-12 使用プライマー

Primer	Sequence
Pro(<i>phbCAB</i>)- <i>SacI</i> -f	5'-CGAGCTC ^{a)} CCCGGGCAAGTACCTTGCCGAC-3'
Ter(<i>phbCAB</i>)- <i>KpnI</i> -r	5'-GGGGTACC ^{b)} CTATGCCCAACAAGGCACTAAG-3'

^{a)} *SacI* recognition site, ^{b)} *KpnI* recognition site

Table 4-13 反応組成液

Components	Volume (μ L)	Final Concentration
2 \times PrimeSTAR GC Buffer (Mg ²⁺ plus)	25	1 \times
dNTP Mix	4	0.2 mM each
Pro(<i>phbCAB</i>)- <i>SacI</i> -f (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
Ter(<i>phbCAB</i>)- <i>KpnI</i> -r (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
Template DNA	x	< 1 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 units/50 μ L
滅菌水	up to 50	

Table 4-14 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	68°C	5 min (to step 2 \times 30)
Cool	4°C	∞

・使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC buffer (TaKaRa)

IV. pRKmScK-C1GAB の作製

まず pBSHE9 の *phaG_{ps}* 遺伝子部位を PCR にて増幅し (Tables 4-15、4-16 and 4-17)、0.9-kb 断片を切り出し、TaKaRa Mighty TA-cloning Kit for PrimeSTAR (TaKaRa) を用いて dA 付加を行い、pMD20-T vector に挿入した。その後、このプラスミドを *HindIII* および *XhoI* で消化して得られた 0.9-kb *HindIII-XhoI* 断片を inverse PCR (Tables 4-18、4-19 and 4-20) によって、*HindIII* および *XhoI* 部位を付与した pRKmScK-C1AB に挿入した。作製したプラスミドは、EmeraldAmp PCR Master Mix を用いたコロニーPCR および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て目的遺伝子が導入されていることを確認した。上記のように、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native プロモーターの支配下で、*phaCI_{ps}*、*phaG_{ps}*、*phbA_{re}*、*phbB_{re}* 遺伝子が発現するように設計したプラスミド pRKmScK-C1GAB を構築した。

【TA クローニング】

Taq DNA ポリメラーゼをベースとする PCR 酵素を用いて得られた増幅産物のほとんどは、その 3'末端にデオキシリボアデノシン (dA) が一塩基付加されている。これらの PCR 増幅産物をクローニングする方法として、5'末端にデオキシリボチミジン (dT) を一塩基付加した T ベクターを使用した TA クローニングがある。一方、PrimeSTAR シリーズにより増幅された PCR 産物のほとんどは、平滑末端となっており、このままでは TA クローニングに用いることができない。しかしながら、PCR 産物の 3'末端に dA 付加を行い、TA クローニングに用いることで効率的かつ簡便にクローニングすることができる。今回は、TaKaRa Mighty TA-cloning Kit for PrimeSTAR (TaKaRa) を用いて dA 付加を行い、ライゲーション反応を行った。

Table 4-15 使用プライマー

Primer	Sequence
<i>phaG</i> -SD (<i>HindIII</i>)-f	5'-CCCAAGCTT ^{a)} GCATACCCGCTTGCCAGGAGT-3'
<i>phaG</i> - <i>XhoI</i> (TGA)-r	5'-CCGCTCGAG ^{b)} TCAAATTGCCAATGCATGGTG-3'

^{a)} *HindIII* recognition site, ^{b)} *XhoI* recognition site

Table 4-16 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg^{2+} plus)	10	1 \times
dNTP Mix	4	0.2 mM each
phaG-SD(HindIII)-f (10 μM)	1.5	0.3 μM
phaG-XhoI(TGA)-r (10 μM)	1.5	0.3 μM
Template DNA	x	< 1 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 units/50 μL
滅菌水	up to 50	

Table 4-17 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	68°C	1 min (to step 2 \times 30)
Cool	4°C	∞

・ 使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

Table 4-18 使用プライマー

Primer	Sequence
phbA(Re)-SD(XhoI)-f2	5'-CCGCTCGAG ^{a)} GTTCCCTCCCGTTTCCATTGAAAGGACT-3'
phaC1-HindIII(TAA)-r3	5'-CCCAAGCTT ^{b)} CTAGACTGCCTACAACCTAACGTTTCATG-3'

^{a)} XhoI recognition site, ^{b)} HindIII recognition site

Table 4-19 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
2 \times PrimeSTAR GC Buffer (Mg^{2+} plus)	25	1 \times
dNTP Mix	4	0.2 mM each
phbA(Re)-SD(XhoI)-f2 (10 μM)	1.5	0.3 μM
phaC1-HindIII(TAA)-r3 (10 μM)	1.5	0.3 μM
Template DNA	x	< 1 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 units/50 μL
滅菌水	up to 50	

Table 4-20 サイクリング条件

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

・使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC buffer (TaKaRa)

4-2-3 *R. eutropha* H16 の *phbC_{Re}* 遺伝子破壊株の作製

組換え *R. eutropha* による二酸化炭素からの物性の優れた共重合ポリエステルの生合成を目指し、*Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC_{1Ps}*) を導入した組換え株作製のために、*R. eutropha* H16 の PHA 重合酵素遺伝子 (*phbC_{Re}*) のみを破壊した株を作製することにした。

まず、*R. eutropha* H16 のゲノム DNA を鋳型として、PCR を行い (Tables 4-21、4-22 and 4-23)、*phbC_{Re}* 遺伝子内部の 0.8-kb *Hind*III-*Xba*I 領域を増幅した。この増幅産物を *Hind*III および *Xba*I で消化し、プラスミドベクター pBluescript II KS⁺ の *Hind*III および *Xba*I 部位にクローニングした。作製したプラスミドは、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て目的遺伝子が導入されていることを確認した。このプラスミドを *Hind*III および *Xba*I で消化して得られた 0.8-kb *Hind*III-*Xba*I 断片を自殺ベクター pBSL182 の *Hind*III および *Xba*I 部位にライゲーションし、*E. coli* S17-1(λ *pir*) を形質転換した。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て目的遺伝子が導入されていることを確認し、プラスミド pLGm-HX8 と命名した。作製した pLGm-HX8 を *E. coli* S17-1(λ *pir*) を介した接合伝達法 (Appendix-2 protocols 参照) により *R. eutropha* H16 へ導入した。接合伝達により *R. eutropha* H16 に導入された組換えプラスミド pLGm-HX8 は、IS 配列に挟まれたゲンタマイシン耐性遺伝子と *phbC_{Re}* 遺伝子の一部がトランスポゾンにより *R. eutropha* H16 の染色体上の *phbC_{Re}* 遺伝子の一部と置き換わり、*R. eutropha* H16 の *phbC_{Re}* 遺伝子が破壊される。以上のように、*phbC* 遺伝子破壊株 *R. eutropha*

C-TnGmHX8 を作製した。

Table 4-21 使用プライマー

Primer	Sequence
phbC-f2 (R. eut) HindIII	5'-CCCAAGCTT ^{a)} CGCCAACCTTCCTTGCCACCAA-3'
phbC-r2 (R. eut) XbaI	5'-GCTCTAGA ^{b)} TAGGTGTGGCGCAGGTACCAG-3'

^{a)}HindIII recognition site, ^{b)}XbaI recognition site

Table 4-22 反応組成液

Components	Volume (μ L)	Final Concentration
10 \times LA Taq Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5	1 \times
dNTP Mix	4	0.2 mM each
phbC-f2 (R. eut) HindIII (10 μ M)	2.5	0.5 μ M
phbC-r2 (R. eut) XbaI (10 μ M)	2.5	0.5 μ M
Template DNA	x	< 1 μ g
TaKaRa LA Taq (5 units/ μ L)	0.5	2.5 units/50 μ L
滅菌水	up to 50	

Table 4-23 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	94°C	1 min
Anneal	64°C	1 min
Extend	72°C	1 min (to step 2 \times 30)
Cool	4°C	∞

・使用酵素

TaKaRa LA Taq (TaKaRa)

4-2-4 組換え株の作製

本章で作製したプラスミド pRKmKSc-C1AB、pRKmKSc-C1G、pRKmKSc-C1GAB および pRKmScK-C1GAB を PHA 合成能欠損株である *R. eutropha* PHB4 および *R. eutropha* C-TnGmHX8 に *E. coli* S17-1 を介した接合伝達法にて導入し、組換え株を作製した。これ

らの組換え株を従属栄養あるいは独立栄養条件下にて培養した。PHA の定量は、得られた乾燥菌体に含まれる PHA をメタノリシスによって、3-ヒドロキシアルカン酸メチルエステルに変換し、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いて行った (Appendix-2 protocols 参照)。

<独立栄養条件下 (近畿大学産業理工学部にて実施) >

・培養方法

【前培養】

- 1) 白金耳で掻きとった菌体を滅菌生理食塩水に懸濁した。
- 2) 300 mL 容三角フラスコに滅菌済みの MS 液体培地を 15 mL 入れ、2)の菌体を培地に 1 mL 接種した (初発の菌濃度は一定となるようにした)。
- 3) 24 時間毎に、混合基質ガスとして $H_2:O_2:CO_2 = 8:1:1$ の割合で封入し、170 (stroke/min)、 $30^\circ C$ で振とう培養を行った。
- 4) 対数増殖後期の菌体を回収し、フラスコ培養試験を行った。

【フラスコ培養試験】

- 1) 前培養の操作 1)、2)を行った。
- 2) 測定を行うごとに基質ガスを封入した。
- 3) 一定培養時間毎に菌体増殖量を分光光度計 (600 nm) で測定し、簡易 pH メータで pH を測定した。

4-2-5 ポリエステルの性質と物性評価

組換え株のうち、*R. eutropha* C-TnGmHX8/pRKmKSc-C1GAB 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。ポリエステルを乾燥菌体 1.2 g からクロロホルム 1 L 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。分子量はゲル浸透クロマトグラフィーにより分析し、精製した共重合ポリエステルの詳細なモノマー組成については、GC/MS および NMR 解析により調べた。熱的特性および機械的特性を調べるために、ソルベントキャストフィルムを作製し、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。熱的特性に

については、Perkin-Elmer Pyris 1 DSC (PerkinElmer, USA) を用いた DSC により調べた。また、そのフィルムを引っ張り試験に供し、機械的特性についても調べた。

4-3 結果および考察

R. eutropha を宿主として、糖および二酸化炭素から物性の優れた P(3HB-co-3HA) を合成するために、これまでに、低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子である *Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaC1* を *R. eutropha* PHB4 に導入した組換え株が作製された。しかしながら、この組換え株で、脂肪酸を炭素源として培養すると、共重合ポリエステルを合成したが、糖を炭素源として培養すると、P(3HB)ホモポリマーしか合成されなかった (Table 4-24) (祝迫、稲田、近藤、未発表)³⁾。これは、*R. eutropha* が 3HA ユニット供給経路としてβ酸化からの経路は有しているが、脂肪酸合成経路からの経路は有していないことが原因であると考えられる。そこで、本章では、*lac* プロモーターあるいは、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子 (*phbCAB* オペロン) の native プロモーターによって、*Pseudomonas* sp. 61-3 の *phaC1*、*phaG* 遺伝子および *R. eutropha* の *phbAB* 遺伝子が発現するように設計したプラスミド (pRKmKSc-C1GAB、pRKmKSc-C1G、pRKmScK-C1GAB) を構築し、PHA 合成能欠損株である *R. eutropha* PHB4 および *R. eutropha* C-TnGmHX8 に導入した。そして、従属栄養条件下あるいは独立栄養条件下にて培養し、これらの組換え株が合成した PHA の蓄積率とモノマー組成を調べた。

Table 4-24 Accumulation of PHA by recombinant *R. eutropha* PHB⁻4 strains harboring *phaC1_{PS}* and *phbAB_{Re}* genes (under the control of *lac* promoter)

plasmid	Substrate	Dry cell PHA		PHA composition (mol%)							
		weight (g/L)	content (wt%)	3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')		
pBBR1 ⁺ C1 _{PS} AB _{Re}	Fructose	1.58	52	100	0	0	0	0	0	0	0
(P _{Re} , <i>phaC1</i> , <i>phbA</i> , <i>phbB</i>)	Tetradecanoate	0.67	7	44	4	20	18	17	0	0	0
pRKmKSc46	Fructose	0.82	12	100	0	0	0	0	0	0	0
(P _{PS} , <i>phaC1</i> , <i>phbA</i> , <i>phbB</i>)	Tetradecanoate	0.83	18	31	4	27	22	16	0	0	0
pRKmKSc54	Fructose	0.77	5	100	0	0	0	0	0	0	0
(P _{PS} , <i>phaC1</i> , P _{Re} , <i>phbA</i> , <i>phbB</i>)	Tetradecanoate	0.79	17	3	10	27	19	8	0	0	0
pRKmKSc-C1AB	Fructose	1.66	34	100	0	0	0	0	0	0	0
(P _{lac} , <i>phaC1</i> , <i>phbA</i> , <i>phbB</i>)	Tetradecanoate	0.51	7	27	9	19	24	21	0	0	0

Cells were cultivated at 30°C for 72 h in a mineral salt medium containing fructose (2% wt/vol) or the sodium salt of tetradecanoate (0.5% wt/vol) as the sole carbon source.

3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-*cis*-dodecanoate

R. eutropha PHB4 の組換え株において、糖を炭素源とした場合、pRKmKSc-C1GAB 導入株で 3HA 分率が 3.4 mol%導入された P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルが 25 wt%合成・蓄積された (Table 4-25)。一方、*R. eutropha* C-TnGmHX8 の組換え株においては、*phaG* 遺伝子が挿入されていない pRKmKSc-C1AB 導入株においては、P(3HB)ホモポリマーしか合成されず、PHA 蓄積率は 17.9 wt%であった。しかしながら、*phaG* 遺伝子を挿入した pRKmKSc-C1G、pRKmKSc-C1GAB の両導入株で、3HA 分率が 2.4 mol%程度導入された P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルが約 25 wt%合成・蓄積された (Table 4-26)。これは低密度ポリエチレンと同等の物性を示した場合の P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルのモノマー組成ともよく似ているため¹⁰⁾、優れた物性の PHA であることが考えられた。そこで、これらの組換え株のうち、*R. eutropha* C-TnGmHX8/pRKmKSc-C1GAB の乾燥菌体からポリエステルを抽出し、PHA の物性評価を行った。GC/MS および 500 MHz ¹H-NMR、125 MHz ¹³C-NMR の結果、3HB、3HV、3H4MV (3-ヒドロキシ-4-メチル吉草酸)、3HHx、3HO がそれぞれ、97.6 mol%、1.0 mol%、0.3 mol%、0.3 mol%、0.8 mol%であり、中鎖長 3HA ユニットの取り込みはわずかであった。また、3HD や 3HDD、3H5DD は含まれておらず、炭素数が 10 以上の 3HA ユニットの取り込みはみられなかった (Table 4-27)。

ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分析の結果、数平均分子量 M_n は 32.5 万、重量平均分子量 M_w は 71.8 万であった。DSC による熱的性質分析では、ガラス点移転が 7.7°C、融点が 151°C、融解エンタルピーは 70.1 J/g であった (data not shown)。また引っ張り試験による機械的性質の分析では、弾性率が 1057±66 MPa、引張強度は 27±2 MPa、破断伸びは 23±3%であった (Table 4-28)。P(3HB)と比較して、熱的特性は低い値を示した。また機械的特性でも、P(3HB)よりもやや低い値を示しているが、破断伸びについては、P(3HB)よりも高値を示し、わずかではあるが P(3HB)よりは伸縮性のある素材であることが示された。この物性試験の結果からもわずかに中鎖長の 3HA モノマーが導入されていることがわかった (Tables 4-27 and 4-28)。しかしながら、より物性の優れた PHA を合成するには、さらに 3HA 分率をあげる必要がある。

次に、*R. eutropha* C-TnGmHX8 の組換え株 (pRKmKSc-C1G および pRKmKSc-C1GAB 導入株) で、*lac* プロモーターの支配下で、二酸化炭素を唯一の炭素源として培養した結果、pRKmKSc-C1G 導入株を 60 時間培養したとき、59.1 wt%の PHA が合成された (Table 4-29)。一方、pRKmKSc-C1GAB 導入株では、PHA 蓄積率が 20 wt%であった。しかしながら、pRKmKSc-C1GAB 導入株でわずかな 3HA ユニットの導入がみられたものの、合成された

PHA 鎖中への 3HA ユニットの取り込みはほとんどみられなかった。

次に、構成的に遺伝子を発現する *R. eutropha* の *phbCAB* オペロンの native プロモーターによって *Pseudomonas* sp. 61-3 由来 *phaC1_{ps}*、*phaG_{ps}* 遺伝子および *R. eutropha* 由来 *phbAB_{Re}* 遺伝子が発現するように設計した pRKmScK-C1GAB を導入した組換え株の結果を Table 4-30 に示した。*R. eutropha* PHB4 の組換え株で、糖を炭素源として培養した場合、21.3 wt% の PHA が合成されが、合成された PHA 鎖中への 3HA ユニットの取り込みはみられなかった。一方、*R. eutropha* C-TnGmHX8 の組換え株においては、*R. eutropha* の native プロモーターの支配下では、PHA はほとんど合成されなかった。

Table 4-25 Accumulation of PHA by recombinant *R. eutropha* PHB⁻4 strains harboring *phaCI*G_{Ps} and *phbAB*_{Re} genes

plasmid (relevant marker)	Substrate	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA composition (mol%)						
				3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')	
pBBRMCS-2	Fructose	0.58	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tetradecanoate	0.72	0	0	0	0	0	0	0	0
pRKmKSc-CIAB	Fructose	1.66	34.0	100	0	0	0	0	0	0
(P _{lac} , <i>phaCI</i> _{Ps} , <i>phbAB</i> _{Re})	Tetradecanoate	0.51	7.0	27	9	19	24	16	0	0
pRKmKSc-CIG	Fructose	0.84	0.4	100	0	0	0	0	0	0
(P _{lac} , <i>phaCI</i> _{Ps})	Tetradecanoate	0.62	9.3	36	16	24	16	8	0	0
pRKmKSc-CIGAB	Fructose	1.10	25.0	96.6	0.3	1.3	1.2	0.4	0.2	0
(P _{lac} , <i>phaCI</i> _{Ps} , <i>phbAB</i> _{Re})	Tetradecanoate	0.06	2.5	83	Trace	17	Trace	Trace	0	0

Cells were cultivated at 30°C for 72 h in a mineral salt medium containing fructose (2% wt/vol) or the sodium salt of tetradecanoate (0.5% wt/vol) as the sole carbon source.

3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-*cis*-dodecanoate

Table 4-26 Accumulation of PHA by recombinant *R. eutropha* C-TnGmHX8 strains harboring *phaCI*G_{PS} and *phbA*B_{Re} genes

plasmid	Substrate	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA composition (mol%)					
				3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')
pRKmKSc-CIAB (P _{lic} , <i>phaCI</i> _{PS} , <i>phbA</i> , <i>phbB</i> _{Re})	Fructose	1.0	17.9	100	0	0	0	0	0
pRKmKSc-CIG (P _{lic} , <i>phaCI</i> _{PS} , <i>phaG</i> _{PS})	Fructose	1.2	25.8	95.5	0.7	1.3	1.6	0.5	0.4
pRKmKSc-CIGAB (P _{lic} , <i>phaCI</i> , <i>phaG</i> , <i>phbA</i> , <i>phbB</i>)	Fructose	1.4	23.7	95.4	0.8	1.3	1.4	0.8	0.3

Cells were cultivated at 30 °C for 72 h in a mineral salt medium containing fructose (2% wt/vol) as the sole carbon source.

3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-*cis*-dodecanoate

Table 4-27 Characterization of PHA accumulated by recombinant *R. eutropha* C-TnGmHX8 harboring pRKmKSc-CIGAB

plasmid	PHA composition (mol%)					
	3HB (C4)	3HV (C5)	3H4MV (C6)	3HHx (C6)	3HO (C8)	
pRKmKSc-CIGAB (P_{lac} , <i>phaC1</i> , <i>phaG</i> , <i>phbAB</i>)	97.6	1	0.3	0.3	0.8	

PHA compositions were determined by GC/MS, and confirmed by 500 MHz ¹H-NMR and 125 MHz ¹³C-NMR. 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HV, 3-hydroxyvalerate; 3H4MV, 3-hydroxy-4-methylvalerate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate

Table 4-28 Properties of PHA accumulated by recombinant *R. eutropha* C-TnGmHX8 harboring pRKmKSc-CIGAB

Sample	Melting temperature (°C)	Grass-transition temperature (°C)	Young's modulus (GPa)	Tensile strength (MPa)	Extension to break (%)
P(3HB)	176	4	3.5	40	5
P(97.6% 3HB-co-3HA) (This study)	151	8	1.1	27	23
P(94% 3HB-co-3HA) ⁽¹⁰⁾	133	-8	0.2	17	680
PP	176	-10	1.7	38	400
LDPE	130	-30	0.2	10	620

Table 4-29 Accumulation of PHA by recombinant *R. eutropha* C-TnGmHX8 strains harboring *phaCIG_{Ps}* and *phbAB_{Re}* genes from CO₂ as the sole carbon source

plasmid (relevant marker)	Substrate	Cultivation time (h)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA composition (mol%)					
					3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')
pRKmKSc-CIG	CO ₂	30	1.7	23.1	100	0	0	0	0	0
(P _{lac} , <i>phaCIG_{Ps}</i>)	CO ₂	45	3.7	48.1	100	0	0	Trace	0	0
	CO ₂	60	4.1	59.1	100	0	0	Trace	0	0
pRKmKSc-CIGAB	CO ₂	30	2.3	14.0	99.6	0	0	0.2	0.2	0
(P _{lac} , <i>phaCIG_{Ps}</i> , <i>phbAB_{Re}</i>)	CO ₂	45	1.8	16.7	98.9	0	0	1.1	0	0
	CO ₂	60	2.2	20.0	99.9	0	0	0.1	0	0

Cells were cultivated at 30 °C for 30-60 h in a mineral salt medium under the atmosphere of the mixture of H₂, CO₂ and O₂ (8 : 1 : 1) by batch culture.

3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-*cis*-dodecanoate

Table 4-30 Accumulation of PHA by recombinant *R. eutropha* strains harboring *phaCI*_{G_{Ps}} and *phbA*_{B_{Re}} genes

Strain	Cultivation time (h)	Carbon source	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA composition (mol%)					
					3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	3HDD (C12)	3H5DD (C12')
<i>R. eutropha</i> PHB-4/pRKmScK-C1GAB (P _{Re} , <i>phaCI</i> _{G_{Ps}} , <i>phaG</i> _{G_{Ps}} , <i>phaA</i> _{B_{Re}} , <i>phbA</i> _{B_{Re}})	72	Fructose	1.27	21.3	100	0	0	0	0	0
<i>R. eutropha</i> C-TnGmHX8/pRKmScK-C1GAB (P _{Re} , <i>phaCI</i> _{G_{Ps}} , <i>phaG</i> _{G_{Ps}} , <i>phaA</i> _{B_{Re}} , <i>phbA</i> _{B_{Re}})	72	Fructose	0.96	0.1	100	0	0	0	0	0

Cells were cultivated 30°C for 72 h in MS medium containing 2% fructose.

3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3H5DD, 3-hydroxy-*cis*-5-dodecenoate

本章では、組換え *R. eutropha* による脂肪酸合成経路を介した PHA 生産について検討してきたが、*R. eutropha* に *phaCI_{ps}* および *phaG_{ps}* 遺伝子を導入しても、PHA 鎖中に中鎖長 3HA ユニットがあまり取り込まれない原因として、以下の2つを考えた。まず、1つ目として、PhaG_{ps} タンパク質が十分に機能していないことが考えられた。*R. eutropha* C-TnGmHX8/pRKmKSc-C1GAB の乾燥菌体から抽出したポリエステルの GC/MS および NMR 解析の結果、炭素数 10 以上の 3HA ユニットの取り込みがみられなかったことから、PhaG タンパク質が発現していない、あるいは、PhaG_{ps} タンパク質の活性発現には、コファクターなどの存在が必要である可能性が考えられた。そこで、*lac* プロモーターによって、His-tag 融合 PhaG_{ps} が発現するように設計したプラスミドを作製し、*R. eutropha* H16、*R. eutropha* C-TnGmHX8、*Pseudomonas* sp. 61-3、*Pseudomonas* sp. BCG-TcGm (*phbC_{ps}::tet, phaG_{ps}::gen*) および *E. coli* JM109 に導入した。そして、これらの菌体破砕物から精製した可溶性画分を用いて、SDS-PAGE およびウエスタンブロット解析を行い、PhaG_{ps} の発現について調べた。その結果、すべての菌株で、*lac* プロモーターによる His-tag 融合 PhaG タンパク質の発現が細胞内可溶性画分で検出された。*R. eutropha* および *Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株では、33 kDa および 45 kDa の位置に反応が検出された。一方、*E. coli* JM109 の組換え株においては、33 kDa の位置にのみ検出された (data not shown)。これまでに、*Pseudomonas* sp. 61-3 の crude extract を用いてウエスタンブロット解析を行うと 45 kDa に反応が検出されているが、*phaG_{ps}* 遺伝子をセルフクローニングした *Pseudomonas* sp. 61-3 の crude extract を用いてウエスタンブロット解析をすると、33 kDa および 45 kDa に反応が検出され、一方、*phaG_{ps}* 遺伝子を導入した大腸菌では、33 kDa の位置にのみ検出される¹¹⁾。本研究においても、*Pseudomonas* sp. 61-3 および *E. coli* JM109 の組換え株においては、この報告と同様の結果を示した。また、PhaG_{ps} の推定分子量は 33 kDa であるので、*R. eutropha* および *Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株においては、PhaG_{ps} タンパク質と何らかの物質 (約 12 kDa) が結合していると考えられた。このことより、PhaG_{ps} は、コファクターなどの物質が結合することで活性型となる可能性も考えられた。あるいは、この分子量の差が 12 kDa であることから、PhaG_{ps} と結合している物質は、ACP である可能性が考えられる。ACP の分子量は、約 10 kDa であり、*R. eutropha* や *Pseudomonas* sp. 61-3 においては、PhaG_{ps} はこの ACP との親和性が高く、強く結合しているが、PHA 非生産菌の大腸菌 ACP は PhaG_{ps} との親和性が低いのもかもしれない。しかしながら、PHA 合成能欠損株である *R. eutropha* C-TnGmHX8 においても、33 kDa および 45 kDa の位置に反応が検出されていることから、

この反応は、菌体内 PHA 合成に関わらず、宿主依存的であるともいえる。また、*R. eutropha* においても、*Pseudomonas* と同じサイズに反応が検出されていることから、脂肪酸合成経路を介した PHA の合成が *Pseudomonas* と同様に *R. eutropha* でも可能であると推察された。

次に、*R. eutropha* に *phaC1_{ps}* および *phaG_{ps}* 遺伝子を導入しても、PHA 鎖中に中鎖長 3HA ユニットがあまり取り込まれない 2 つ目の原因として、脂肪酸合成におけるマロニル CoA の菌体内プール量が少ないために、3HA-CoA の供給量も少なくなっていることが考えられる。これまでに、*Corynebacterium glutamicum* 由来のアセチル CoA カルボキシラーゼを大腸菌で過剰に発現させることによって、マロニル CoA の菌体内プール量を増加させ、フラボンの合成量を増やすことに成功したという報告がある¹²⁾。同様に、*R. eutropha* においても菌体内マロニル CoA のプール量を増加させれば、脂肪酸合成経路における (R)-3HA-ACP のプール量が増加し、中鎖長 3HA ユニットの PHA 鎖中に多く取り込める可能性がある。そこで、*P. aeruginosa* のゲノム DNA よりアセチル CoA カルボキシラーゼ遺伝子 (*accA*、*accD* および *accBC*) をクローニングし、このアセチル CoA カルボキシラーゼ遺伝子とともに *phaC1_{ps}*、*phaG_{ps}*、*phbAB_{re}* 遺伝子を PHA 合成能欠損株である *R. eutropha* PHB4 および *R. eutropha* C-TnGmHX8 に導入した組換え株を作製し、従属栄養条件下での PHA 合成について検討した。その結果、アセチル CoA カルボキシラーゼ遺伝子導入株では、生育が抑制され、PHA 蓄積率が低下した (data not shown)。アセチル CoA カルボキシラーゼはビオチン依存性であるので、ビオチンや、TCA サイクルの回転を促進するためのクエン酸やパントテン酸の培地への添加が必要かもしれない。Table 4-27 に示した通り、GC/MS および NMR 解析の結果、合成された PHA 鎖中に 3H4MV¹³⁾ が取り込まれていることや炭素数 10 以上の 3HA ユニットの取り込みがみられないことから、脂肪酸合成経路を介して (R)-3HA-CoA は供給されていないと考えられた。最近、PhaG は CoA トランスフェラーゼ活性よりもチオエステラーゼ活性が高いという報告があり¹⁴⁾、PhaG は、(R)-3HA-ACP から (R)-3HA-CoA を生成するよりもむしろ (R)-3-ヒドロキシアルカン酸 ((R)-3HA) を生成することがわかった。したがって、中鎖長の 3HA ユニットが導入された PHA を合成するためには、PhaC1_{ps} および PhaG_{ps} だけでなく (R)-3-ヒドロキシアシル CoA ((R)-3HA-CoA) リガーゼが必要であるといえる。そこで、次の第五章では、(R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子をクローニングし、PHA 重合酵素およびモノマー供給系に関わる酵素遺伝子を導入した大腸菌組換え株を作製し、中鎖長の 3HA ユニットが導入された共重合ポリエステルの合成を試みる。

4-4 小括

本章では、*lac* プロモーターあるいは構成的に遺伝子を発現する *R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子 (*phbCAB* オペロン) の *native* プロモーターの下流に *phaC1_{Ps}*、*phaG_{Ps}* および *phbAB_{Re}* 遺伝子を導入した *R. eutropha* の組換え株を作製し、*R. eutropha* による脂肪酸合成経路を介した糖および二酸化炭素からの PHA 生産について検討した。

まず、*R. eutropha* PHB4 を宿主とした場合、*lac* プロモーターの支配下で糖を炭素源として培養すると、3HA 分率が 3.4 mol% 導入された P(3HB-*co*-3HA) 共重合ポリエステルが 25 wt% 合成された。一方、*R. eutropha* の *native* プロモーターの支配下で糖を炭素源として培養した場合、21.3 wt% の PHA が蓄積されたが、合成された PHA 鎖中への中鎖長 3HA ユニットの取り込みはみられなかった。

次に、*R. eutropha* C-TnGmHX8 を宿主として、*lac* プロモーターの支配下で糖を炭素源として培養した場合、pRKmKSc-C1G および pRKmKSc-C1GAB 導入株で、炭素数 6~12 の 3HA ユニットの 5 mol% 程度導入された P(3HB-*co*-3HA) 共重合ポリエステルが約 25 wt% 合成された。そこで、この組換え株のうち、*R. eutropha* C-TnGmHX8/pRKmKSc-C1GAB の乾燥菌体からポリエステルを抽出し、GC/MS、GPC、¹H-NMR、¹³C-NMR、DSC、引っ張り試験を行い、このポリエステルの物性評価を行った。その結果、3HB 分率が 97.6 mol%、3HA 分率が 2.4 mol% で、中鎖長 3HA ユニットの取り込みはわずかであり、炭素数 10 以上の 3HA ユニットの取り込みはみられなかった。これは、PhaG 酵素が十分に機能していないことが考えられる。また、物性に関しては、破壊伸びが P(3HB) が 5% であるのに対して、このポリエステルは 23±3% であり、P(3HB) よりは、若干ではあるが、伸縮性のある素材であると考えられた。しかしながら、より物性の優れた PHA を合成するためには、さらに中鎖長 3HA 分率を高める必要がある。一方、*R. eutropha* C-TnGmHX8 を宿主として、*R. eutropha* の *native* プロモーターの支配下で糖を炭素源として培養した場合、PHA はほとんど合成されなかった。

また、*R. eutropha* C-TnGmHX8 を宿主として、*lac* プロモーターの支配下で二酸化炭素を唯一の炭素源として培養した場合、約 60% の PHA が合成されが、合成された PHA 鎖中への中鎖長 3HA ユニットの取り込みはほとんどみられなかった。

今後、PHA 生合成における脂肪酸合成経路の代謝フラックスについてもさらなる検討を行う必要がある。最近、PhaG は CoA トランスフェラーゼ活性よりもチオエステラーゼ活

性が高いと報告された¹⁴⁾。したがって、中鎖長の3HAユニットが導入されたPHAを合成するためには、PhaC_{1ps}およびPhaG_{ps}だけでなく(R)-3-ヒドロキシアシルCoA ((R)-3HA-CoA) リガーゼが必要であるといえる。そこで、第五章では、PHA重合酵素遺伝子および(R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子を導入した大腸菌のPHA生合成について検討する。

1. 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
2. Fukui, T., Kato, M., Matsusaki, H., Iwata, T., and Doi, Y. (1998) Morphological and ¹³C-nuclear magnetic resonance studies for polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas* sp. 61-3. *FEMS Microbiol. Lett.*, **164**, 219-225
3. Matsusaki, H., Abe, H., Taguchi, K., Fukui, T. and Doi, Y. (2000) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas* sp. 61-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 401-409
4. Schlegel, H.G., Lafferty, R. and Krauss, I. (1970) The isolation of mutants not accumulating poly-β-hydroxybutyric acid. *Arch. Microbiol.*, **71**, 283-294
5. Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, **1**, 784-791
6. 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
7. Alexeyev, M.F. and Shokolenko, I.N. (1995) Mini-Tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of Gram-negative bacteria. *Gene*, **160**, 59-62
8. Matsumoto, K., Nakae, S., Taguchi, K., Matsusaki, H., Seki, M. and Doi, Y. (2001) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) copolymer from sugars by recombinant *Ralstonia eutropha* harboring the *phaC1_{Ps}* and the *phaG_{Ps}* genes of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, **2**, 934-939
9. 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

10. Matsusaki, H., Abe, H. and Doi, Y. (2000) Biosynthesis and properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, **1**, 17-22
11. 松本謙一郎 (2002) 微生物によるポリヒドロキシアルカン酸生産機構の解析とその応用、博士論文、東京大学大学院
12. Miyahisa, I., Kaneko, M., Funa, N., Kawasaki, H., Kojima, H., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. (2005) Efficient production of (2*S*)-flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 498-504
13. Tanadchangsang, N., Kitagawa, A., Yamamoto, T., Abe, H. and Tsuge, T. (2009) Identification, biosynthesis, and characterization of polyhydroxyalkanoate copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxy-4-methylvalerate. *Biomacromolecules*, **10**, 2866-2874
14. 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

第五章

大腸菌を宿主とした糖からの生分解性

共重合ポリエステルの生合成

～(R)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ

遺伝子のクローニング～

5-1 緒言

第四章では、化学合成独立栄養細菌 *Ralstonia eutropha* を宿主として、糖および二酸化炭素からの炭素数 4~12 の(*R*)-3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) ユニットからなる物性の優れた P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルの合成を試みた。しかしながら、合成された PHA 鎖中への中鎖長 3HA ユニットの取り込みは極わずかであり、実用的なポリエステルの合成には至らなかった。(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼとして知られていた PhaG は、トランスフェラーゼ活性よりもチオエステラーゼ活性が高いことが最近報告された¹⁾。したがって、脂肪酸合成経路を介して中鎖長 3HA ユニットの供給するためには、PhaC_{Ps}および PhaG_{Ps}に加えて、(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA ((*R*)-3HA-CoA) リガーゼが必要であるといえる。

大腸菌は、増殖が速く、菌体内 PHA 分解酵素をもたないことやその生化学的および遺伝的性質が明らかとなっていることから、PHA 生産の宿主として有用であるといえる。また、大腸菌を宿主とした共重合ポリエステルの生合成について、炭素数 3~5 の短鎖長 3HA ユニットの共重合体や中鎖長の PHA 合成に関してはいくつか報告されているが、脂肪酸分解経路 (β酸化) を利用した報告に限られており、脂肪酸合成経路を介して、P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルが合成された報告例はほとんどなく、Tappel らの報告だけである²⁾。Wang らは、*Pseudomonas putida* KT2440 の PP0763 の推定翻訳産物が、*in vitro* で(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性を有する *Pseudomonas oleovorans* 由来の AlkK と相同性が高いことから、PP0763 遺伝子をクローニングし、PP0763 の翻訳産物が(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性を有することを明らかにした¹⁾。その後、Tappel らが *Pseudomonas* sp. 61-3 の改変 PHA 重合酵素遺伝子 *phaC1(STQK)*³⁾とともに、3HB ユニット供給系酵素遺伝子 *phbAB*、*phaG* 遺伝子および PP0763 遺伝子を導入した大腸菌組換え株を作製し、グルコースから P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルの合成に成功している²⁾。

本章では、*Pseudomonas aeruginosa* PAO より(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性を有する新たな酵素を発見した。そして、その遺伝子をクローニングし、PHA 重合酵素遺伝子とともにモノマー供給系に関わる酵素遺伝子を導入した大腸菌組換え株を作製し、糖から生分解性 P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルの合成を試みた。

5-2 実験操作

5-2-1 使用菌株および使用プラスミド

以下の菌株およびプラスミドを本研究に用いた (Table 5-1)。

Table 5-1 使用菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>P. aeruginosa</i> PAO	Wild type	DSM 1707
<i>P. putida</i> KT2440	Wild type	NBRC 100650
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>relA1 supE thi-1</i> Δ (<i>lacZYA-argFVI69</i>) ϕ 80 Δ <i>lacZ</i> Δ M15F λ	Clontech
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)/F ⁺ [<i>traD36 proAB⁺ lac^R</i> <i>lacZ</i> Δ M15]	Novagen
<i>E. coli</i> LS5218	<i>fadR601 atoC2</i> (con)	4)
Plasmids		
pBluescript II KS ⁺	Ap ^r , <i>lacPOZ</i> T7 and T3 promoter	Stratagene
pMD20-T vector	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pMB1 ori	TAKARA BIO
pBBR1MCS-2	Km ^r , broad host range, <i>lac POZ'</i>	5)
pBBR1MCS-3	Tc ^r , broad host range, <i>lac POZ'</i>	5)
pJRD215	Cosmid; Km ^r Sm ^r RSF1010 replicon; Mob ⁺	6)
pRTcASc-MCL(Pa)	pBBR1MCS-3 derivative; <i>lac</i> promoter, PA3924 from <i>P. aeruginosa</i> DSM 1707	This study
pRTcKSc-MCL(Pp)	pBBR1MCS-3 derivative; <i>lac</i> promoter, PP0763 from <i>P. putida</i> NBRC 100650	This study
pBSHE9	pBluescript II KS ⁺ derivative; containing <i>phaG</i> of <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3	This study
pJSeK-C1GAB	pJRD215 derivative; P _{Re} promoter, <i>phaCI</i> _{PS} , <i>phaA</i> _{PS} , <i>phbA</i> _{Re} , <i>phbB</i> _{Re}	This study
pJSeK-C1G	pJRD215 derivative; P _{Re} promoter, <i>phaCI</i> _{PS} , <i>phaG</i> _{PS}	This study

5-2-2 組換えプラスミドの作製

I. pJScK-C1GAB の作製

まず、プラスミド pRKmScK-C1GAB を鋳型として、Table 5-2 のプライマーを用いて、PCR を行い (Tables 5-3 and 5-4)、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native プロモーター、*phaC1_{ps}* 遺伝子、*phaG_{ps}* 遺伝子および *phbAB_{Re}* 遺伝子を含む領域を増幅させた。これを *SacI* および *KpnI* で制限酵素処理後、pJRD215 ベクターの *SacI* および *KpnI* 部位にクローニングし、プラスミド pJScK-C1GAB を作製した。アガロースゲルからの DNA 抽出には、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使用した。また、作製したプラスミドは、EmeraldAmp PCR Master Mix (TaKaRa) を用いたコロニーPCR および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て目的遺伝子が導入されていることを確認した。

Table 5-2 使用プライマー

	Sequence
M13 Forward primer	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13 Reverse primer	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Table 5-3 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
2 \times Gflex PCR Buffer (Mg^{2+} , dNTP plus)	25	1 \times
M13 Forward primer (10 μM)	1	0.2 μM
M13 Reverse primer (10 μM)	1	0.2 μM
Template DNA	x	< 500 ng
Tks Gflex DNA polymerase	0.5	1.25 units/50 μL
滅菌水	up to 50	

Table 5-4 サイクリング条件

	Temperature	Time
Preheat	94°C	3 min
Denature	98°C	10 sec
Anneal	55°C	15 sec
Extend	68°C	2.5 min (to step 2 \times 30)
Cool	4°C	∞

- 使用酵素

TaKaRa Tks Gflex DNA polymerase (TaKaRa)

II. pJScK-C1G の作製

まず、プラスミド pRKmScK-C1GAB を鋳型として、Table 5-5 のプライマーを用いて、PCR を行い (Tables 5-6 and 5-7)、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native プロモーター、*phaC1_{ps}* 遺伝子および *phaG_{ps}* 遺伝子を含む領域を増幅させた。これを *SacI* および *KpnI* で制限酵素処理後、pJRD215 ベクターの *SacI* および *KpnI* 部位にクローニングし、プラスミド pJScK-C1G を作製した。アガロースゲルからの DNA 抽出には、QIAEX II Gel Extraction Kit を使用した。また、作製したプラスミドは、EmeraldAmp PCR Master Mix を用いたコロニーPCR および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て目的遺伝子が導入されていることを確認した。

Table 5-5 使用プライマー

Primer	Sequence
M13 Forward primer	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
<i>phaG</i> - <i>KpnI</i> (TGA)-r	5'-CGGGGTACC ^{a)} TCAAATTGCCAATGCATGGTG-3'

^{a)} *KpnI* recognition site

Table 5-6 反応組成液

Components	Volume (μ L)	Final Concentration
2 \times PrimeSTAR GC Buffer (Mg ²⁺ plus)	25	1 \times
dNTP Mix	4	0.2 mM each
M13 Forward primer (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
<i>phaG</i> - <i>KpnI</i> (TGA)-r (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
Template DNA	x	< 1 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 units/50 μ L
滅菌水	up to 50	

Table 5-7 サイクリング条件

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

- 使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC buffer (TaKaRa)

III. pRTcASc-MCL(Pa)の作製

P. putida KT2440 の PP0763 の翻訳産物が(R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有するとの報告があり、ゲノム情報がすべて明らかとなっている *P. aeruginosa* PAO1 のゲノムを調べたところ、推定中鎖長アシル CoA リガーゼ (PA3924 の推定翻訳産物) が PP0763 の翻訳産物とアミノ酸レベルで 82%の相同性を示した。そこで、この PA3924 遺伝子をクローニングすることとした。

まず、*P. aeruginosa* DSM 1707 のゲノム DNA を鋳型として、Table 5-8 のプライマーを用いて、PCR を行い (Tables 5-9 and 5-10)、PA3924 遺伝子を増幅させた。得られた 1.8 kb の増幅産物を切り出し、TaKaRa Mighty TA-cloning Kit for PrimeSTAR (TaKaRa) を用いて dA 付加を行い、pMD20-T vector に挿入した。その後、このプラスミドを *Apa*I および *Sac*I で消化し、pBBR1MCS-3 ベクターの *Apa*I および *Sac*I 部位にクローニングし、プラスミド pRTcASc-MCL(Pa)を作製した。アガロースゲルからの DNA 抽出には、QIAEX II Gel Extraction Kit を使用した。また、作製したプラスミドは、EmeraldAmp PCR Master Mix を用いたコロニーPCR および制限酵素処理によってインサートチェックを行い、DNA シーケンシングにて目的遺伝子が導入されていることを確認した。

Table 5-8 使用プライマー

Primer	Sequence
MCL- <i>Apa</i> I-f (PAO1)	5'-GGGCCC ^{a)} GCTCCCAGGTGTACGCCCCATGCT-3'
MCL- <i>Sac</i> I-r (PAO1)	5'-GAGCTC ^{b)} GTGTAGGAAAGCCCCGTCAGACGG-3'

^{a)}*Apa*I recognition site, ^{b)}*Sac*I recognition site

Table 5-9 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
5 × PrimeSTAR Buffer (Mg^{2+} plus)	10	1 ×
dNTP Mix	4	0.2 mM each
MCL-ApaI-f (PAO1) (10 μM)	1.5	0.3 μM
MCL-SacI-r (PAO1) (10 μM)	1.5	0.3 μM
Template DNA	x	< 200 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 units/50 μL
滅菌水	up to 50	

Table 5-10 サイクリング条件

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

- ・使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)

IV. pRTcKSc-MCL(Pp)の作製

本研究でクローニングした *P. aeruginosa* PAO1 の PA3924 遺伝子の推定翻訳産物が (R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有するかについて検討するために、対照として *P. putida* KT2440 の PP0763 遺伝子を pBBR1MCS-3 ベクターに挿入したプラスミドを構築した。

まず、*P. putida* NBRC 100650 のゲノム DNA を鋳型として、Table 5-11 のプライマーを用いて、PCR を行い (Tables 5-12 and 5-13)、PP0763 遺伝子を増幅させた。得られた 1.7 kb の増幅産物を切り出し、TaKaRa Mighty TA-cloning Kit for PrimeSTAR を用いて dA 付加を行い、pMD20-T vector に挿入した。その後、このプラスミドを *KpnI* および *SacI* で消化し、pBBR1MCS-3 ベクターの *KpnI* および *SacI* 部位にクローニングし、プラスミド pRTcKSc-MCL(Pp)を作製した。アガロースゲルからの DNA 抽出には、QIAEX II Gel Extraction Kit を使用した。また、作製したプラスミドは、EmeraldAmp PCR Master Mix を用いたコロニーPCR および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

クエンシングにて目的遺伝子が導入されていることを確認した。

Table 5-11 使用プライマー

Primer	Sequence
PP0763-KpnI-f (KT2440)	5'-GGTACC ^{a)} TTTTCAGAAAAGGGATCCCC-3'
PP0763-SacI-r (KT2440)	5'-GAGCTC ^{b)} TTACAACGTGGAAAGGAACG-3'

^{a)} *KpnI* recognition site, ^{b)} *SacI* recognition site

Table 5-12 反応組成液

Components	Volume (μL)	Final Concentration
2 \times PrimeSTAR GC Buffer (Mg^{2+} plus)	25	1 \times
dNTP Mix	4	0.2 mM each
PP0763-KpnI-f (KT2440) (10 μM)	1.5	0.3 μM
PP0763-SacI-r (KT2440) (10 μM)	1.5	0.3 μM
Template DNA	x	< 200 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 units/50 μL
滅菌水	up to 50	

Table 5-13 サイクリング条件

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

・使用酵素

TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC buffer (TaKaRa)

5-2-3 大腸菌組換え株の作製と PHA 生産

P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルを合成するために、本章 5-2-2 で作製したプラスミド pRTcASc-MCL(Pa)あるいはpRTcKSc-MCL(Pp)とともにpJScK-C1GABを*E. coli* JM109あるいは*E. coli* LS5218に導入した組換え株を作製した。また、PA3924 遺伝子の推定翻訳産物

が中鎖長(R)-3HA-CoA を供給する(R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有するかについてさらに検討するために、pRTcASc-MCL(Pa)あるいは pRTcKSc-MCL(Pp)とともに、3HB ユニット供給系酵素遺伝子を除いた pJScK-C1G プラスミドを *E. coli* LS5218 に導入した組換え株を作製した。作製した組換え株およびそれらの培養温度を Table 5-14 に示した。1.5 mL の LB 培地で 37°C、15 時間、前培養を行い、その前培養液を接種量 1% (v/v) となるように 100 mL の LB 培地 (必要に応じて抗生物質を添加) に植菌し、24 時間、48 時間あるいは 72 時間、130 strokes/min で培養した。*E. coli* JM109 においては、培養開始 5 時間後 ($OD_{600}=0.6 \sim 0.8$) で IPTG を 1 mM となるよう培地に添加し、いずれの組換え株とも、培養開始 8 時間後に 2%濃度となるようグルコースを添加した。合成された PHA の分析は、ガスクロマトグラフィーにより行った (Appendix-2 protocols 参照)。

Table 5-14 作製した大腸菌組換え株および培養温度

Strains	plasmids	培養温度
<i>Escherichia coli</i> JM109	pJScK-C1GAB and pBSASc-MCL (Pa)	30°C
<i>E. coli</i> LS5218	pJScK-C1GAB	25°C、30°C
	pJScK-C1GAB and pRTcKSc-MCL (Pp)	25°C、30°C
	pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL (Pa)	25°C、30°C、37°C
	pJScK-C1G	25°C
	pJScK-C1G and pRTcKSc-MCL (Pp)	25°C
	pJScK-C1G and pRTcASc-MCL (Pa)	25°C

5-2-4 ポリエステルの性質と物性評価

組換え株のうち、培養 24 時間後の *E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(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。ポリエステルを乾燥菌体 6.2 g (平均 PHA 蓄積率 19.7 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。分子量はゲル浸透クロマトグラフィーにより分析し、精製した共重合ポリエステルの詳細なモノマー組成については、GC/MS および NMR (500 MHz ^1H -NMR および 125 MHz ^{13}C -NMR) 解析により調べた⁷⁾。熱的特性および機械的特性を調べるために、直径 4.5 cm あるいは 9 cm のシャーレを用い

て、ソルベントキャストフィルムを作製し、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。熱的特性については、Perkin-Elmer Pyris 1 DSC (PerkinElmer, USA) を用いた DSC により調べた。また、そのフィルム (10 mm × 3 mm × 0.05 mm) を引っ張り試験に用い、機械的特性についても調べた。

5-3 結果および考察

5-3-1 大腸菌における P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルを生合成

PhaG は、(R)-3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ活性よりも、(R)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼ活性が高いことが報告され、脂肪酸合成経路を介して中鎖長 PHA を合成するためには、(R)-3HA-CoA リガーゼが必要であるといえる¹⁾。また、Wang らは、*P. putida* KT2440 の中鎖長アシル CoA リガーゼとして知られる PP0763 遺伝子の翻訳産物が(R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有すると報告した¹⁾。本研究では、*P. aeruginosa* PAO1 のゲノムを調べたところ、推定中鎖長アシル CoA リガーゼ遺伝子 PA3924 が PP0763 とアミノ酸レベルで 82%の相同性を示した。したがって、PA3924 遺伝子の翻訳産物も、炭素源を糖とした P(3HB-co-3HA)生合成において PhaG によって遊離した(R)-3HA から(R)-3HA-CoA を供給する(R)-3HA-CoA リガーゼとして機能するのではないかと予想した。そこで、PA3924 遺伝子をクローニングし、PHA 重合酵素遺伝子とともにモノマー供給系に関わる酵素遺伝子を大腸菌に導入した組換え株を作製し、糖からの P(3HB-co-3HA)生合成を試みた。

まず、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native プロモーター、*phaCI*_{Ps} 遺伝子、*phaG*_{Ps} 遺伝子および *phbAB*_{Rc} 遺伝子を含むプラスミド pJScK-C1GAB を作製した。次に、*P. aeruginosa* DSM 1707 のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、1.8 kb の PA3924 遺伝子を増幅させ、プラスミド pRTcASc-MCL(Pa)を作製した。同様に、*P. putida* NBRC 100650 のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、1.7 kb の PP0763 遺伝子を増幅させ、プラスミド pRTcKSc-MCL(Pp)を作製した。さらには、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子の native プロモーター、*phaCI*_{Ps} 遺伝子および *phaG*_{Ps} 遺伝子を含むプラスミド pJScK-C1G を作製した。

そして、pJScK-C1GAB とともに pRTcASc-MCL(Pa)あるいは pRTcKSc-MCL(Pp)をそれぞれ導入した大腸菌組換え株を作製し、グルコースを唯一の炭素源として LB 液体培地で培養した結果を Table 5-15 に示す。さらに、pJScK-C1G とともに pRTcASc-MCL(Pa)あるいは pRTcKSc-MCL(Pp)をそれぞれ導入した大腸菌組換え株を作製し、グルコースを唯一の炭素源として培養した結果を Table 5-16 に示す。 *E. coli* JM109/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)を 30°C で 24 時間および 48 時間培養した結果、炭素数 10 の 3HA ユニットが 1.7-1.8 mol%導入された P(3HB-co-3HA)が 7.8-8.8 wt%合成された。一方、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)を 30°C で 24 時間および 48 時間培養した結果、炭素数 8 と炭素数 10 の 3HA ユニットが 6.2-7.0 mol%導入された P(3HB-co-3HA)が 5.3-7.2 wt%合成された。JM109 の組換え株に比べて、LS5218 の組換え株では、共重合ポリエステルに取り込まれる中鎖長 3HA ユニットが 7 mol%まで増加し、乾燥菌体重量も増加した。したがって、宿主として *E. coli* LS5218 を用いた方が、糖からの P(3HB-co-3HA)合成において、より中鎖長 3HA ユニットを取り込みやすいと考えられた。*E. coli* LS5218 は、*fadR* が欠損していることから、脂肪酸を炭素源とした場合も、糖を炭素源とした場合においても P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの生合成において好ましい宿主であると考えられる^{1,8,9)}。次に培養温度を 25°C とした場合、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB が P(3HB)ホモポリマーのみを合成したのに対して、推定(R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子を導入した *E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)あるいは *E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcKSc-MCL(Pp)では、炭素数 4、8 および 10 の 3HA ユニットからなる P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルが合成された。*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcKSc-MCL(Pp)は、炭素数 10 の 3HA ユニットが 2.3-2.6 mol%導入された P(3HB-co-3HA)が 4 wt%合成された。一方、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)は、炭素数 8 および 10 の 3HA ユニットが 5.1-7.1 mol%導入された P(3HB-co-3HA)が 20 wt%合成され、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTc KSc-MCL(Pp)と比べて、中鎖長 3HA 分率も PHA 蓄積率も高かった。PA3924 遺伝子を導入した組換え株においても、PP0763 遺伝子を導入した組換え株と同様に中鎖長 3HA ユニットが取り込まれた P(3HB-co-3HA)が合成されたことから、PA3924 遺伝子の翻訳産物も(R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有することが明らかになった。さらに、*phbAB_{re}* 遺伝子を除いた組換え株においても、PA3924 遺伝子導入株および PP0763 遺伝子導入株で中鎖長 3HA ユニットだけからなる共重合ポリエステルが合成された (Table 5-16)。したがって、PA3924 遺伝子および PP0763 遺伝子の翻訳産物が脂肪酸合成経路を介

した中鎖長 PHA の合成に関与していることがみてとれる。また、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)を 25°C で培養した際の PHA 生産量は、1.04-1.10 g/L であり、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcKSc-MCL(Pp)の PHA 生産量 (0.14-0.17 g/L) の約 7 倍であった。*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)において、30°C で培養した場合の PHA 蓄積率が 5.3-7.2 wt%であったのに対して、25°C で培養した場合では約 20 wt%であり、約 3-4 倍であった (PHA 生産量は 4.3-6.5 倍)。また、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB において、25°C で培養した場合には、P(3HB)ホモポリマーが合成されたのに対して、30°C で培養した場合には PHA が合成されなかった。さらに、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)において、37°C で培養すると、生育最適温度であるにも関わらず、PHA は合成されなかった。つまり、培養温度を低くすると PHA の合成が増加した。この理由として、培養温度を低くし、生育と脂肪酸合成経路における代謝回転が抑制されることで、PhaG_{ps}と(R)-3HA-CoA リガーゼによって脂肪酸合成経路から供給される PHA 重合酵素の基質となる(R)-3HA-CoA のプール量が増加したのではないかと推察した。PhaC1_{ps}は、短鎖長および中鎖長のモノマーに対して幅広い基質特異性をもつため、3HB 分率が高い P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの合成が可能であるが、PhaC1_{ps}は、3HB モノマーよりも中鎖長 3HA モノマーとの親和性が高いため、P(3HB)ホモポリマーはあまり合成できない。しかしながら、炭素数が 6~12 の(R)-3HA-CoA が存在することで 3HB ユニットがポリエステル鎖に取り込まれやすくなるのかもしれない。したがって、培養温度を低くし、十分な量の(R)-3HA-CoA が供給されたことで、P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの合成が促進された可能性がある。また、*E. coli* LS5218/pJScK -C1GAB and pRTcKSc-MCL(Pp)が合成した P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルに比べて、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)が合成した P(3HB-co-3HA)の中鎖長 3HA 分率は、5.1-7.4 mol%と高かったことから、PA3924 遺伝子の推定翻訳産物は、PP0763 遺伝子の翻訳産物とは異なる基質特異性を有しており、中鎖長の 3HA-CoA を効率的に供給できる可能性がある。共重合ポリエステルのモノマー組成は、そのポリエステルの熱的特性および機械的特性に非常に影響を与えることから、実用的な PHA の生産において、(R)-3HA-CoA リガーゼの基質特異性は、PHA 重合酵素の基質特異性と同等に重要である。

Table 5-15 PHA production in recombinant *E. coli* strains.

Strains and plasmids	Cultivation time (h)	Cultivation temperature (°C)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA concentration (g/L)	PHA composition (mol%)				
						3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)	
JM109										
pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)	24	30	2.4	7.8	0.19	98.3	0	Trace	1.7	
	48	30	1.2	8.8	0.11	98.2	0	Trace	1.8	
LS5218										
pJScK-C1GAB	24	25	3.5	4.2	0.15	100	0	0	0	
	48	25	4.3	7.6	0.33	100	0	0	0	
	72	25	3.9	4.6	0.18	100	0	0	0	
	24	30	3.2	0	0	0	0	0	0	
	48	30	3.3	0	0	0	0	0	0	
pJScK-C1GAB and pRTcKSc-MCL(Pp)										
	24	25	4.1	3.5	0.14	100	0	0	0	
	48	25	4.0	4.2	0.17	97.7	0	0	2.3	
	72	25	3.8	3.8	0.14	97.4	0	0	2.6	
	24	30	3.7	0.6	0.02	100	0	0	0	
	48	30	3.1	0.5	0.02	100	0	0	0	
pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)										
	24	25	5.3	19.7	1.04	94.1	0	1.2	4.7	
	48	25	5.4	19.4	1.05	94.9	0	0.2	4.9	
	72	25	5.4	20.3	1.10	92.6	0	2.3	5.1	
	24	30	3.4	7.2	0.24	93.0	0	1.5	5.5	
	48	30	3.2	5.3	0.17	94.8	0	Trace	6.2	
	24	37	2.2	0	0	0	0	0	0	

Cells were cultivated at 25°C, 30°C or 37°C for 24 h, 48 h or 72 h in LB medium. 2% glucose was added to the medium after 8 h of cultivation. 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate

Table 5-16 Accumulation of PHA by recombinant *E. coli* LS5218 harboring *phaC1G_{Ps}* and 3HA-CoA ligase gene

plasmids	Cultivation time (h)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt%)	PHA composition (mol%)			
				3HB (C4)	3HHx (C6)	3HO (C8)	3HD (C10)
pJScK-C1G	24	3.7	0	0	0	0	0
(P _{Re} , <i>phaC1G_{Ps}</i>)	48	4.9	0	0	0	0	0
	72	4.2	0	0	0	0	0
pJScK-C1G and pRTcKSc-MCL (Pp)	24	4.4	Trace	Trace	0	0	0
(P _{Re} , <i>phaC1G_{Ps}</i>) (P _{lac} , PP0763 gene _{Pp})	48	5.1	0.3	Trace	0	0	100
	72	3.5	1.3	Trace	0	0	100
pJScK-C1G and pRTcASe-MCL (Pa)	24	3.6	0.4	Trace	0	0	100
(P _{Re} , <i>phaC1G_{Ps}</i>) (P _{lac} , PA3924 gene _{Pa})	48	5.0	0.8	Trace	0	22.8	77.2
	72	4.5	1.1	Trace	0	21.3	78.7

Cells were cultivated at 25°C for 24 h, 48 h or 72 h in LB medium. 2% glucose was added to the medium after 8 h of cultivation. 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate

5-3-2 合成された P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステル の性質と特徴

培養 24 時間後の *E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)が合成した P(3HB-co-3HA)の詳細な性質を調べた。まず、¹H-NMR 解析によってモノマー組成を調べた結果、3HB 分率が 96.4 mol%、炭素数 8 および 10 の中鎖長 3HA 分率が 5.4 mol%であった。さらに、トリメチルシリル化 (TMS 化) したサンプルを GC/MS で分析した結果、この共重合ポリエステルには、わずかではあるが炭素数 12 および 14 の 3HA ユニットもポリエステル鎖に取り込まれていることが明らかになった (Fig. 5-1)。Figure 5-2 に、¹³C-NMR 解析の結果を示した。P(3HB-co-3HA)のピークのうち、169.0-169.3 ppm に 3HB と 3HA ユニットからなる 3HB*-3HB および 3HB*-3HA+3HA*-3HB の 2 つのピークが確認できた。したがって、本研究で合成された P(3HB-co-3HA)は、短鎖長 PHA と中鎖長 PHA のブレンドではなく、3HB と中鎖長の 3HA からなる共重合ポリエステルであることが明らかとなった。

ゲル浸透クロマトグラフィーにより、分子量を分析した結果、本研究で合成された P(3HB-co-5.4% 3HA)共重合ポリエステルの数平均分子量 (M_n) は 233×10^3 、重量平均分子量 (M_w) は、 459×10^3 、多分散度 (M_w/M_n) は 2.0 であり、Tappel らが報告した大腸菌によって合成された P(3HB-co-5% 3HA)、P(3HB-co-7% 3HA)および P(3HB-co-8% 3HA)の M_n (106×10^3 、 96×10^3 および 94×10^3) より 2.2-2.5 倍高かった (Table 5-17)。Tappel らは、高発現ベクター pTrec99A を用いて *phaG* 遺伝子および PP0763 遺伝子を高発現させることによって、P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの生産量を高くしている²⁾。しかしながら、それにより PHA 重合酵素の発現量も多くなり、分子量が低くなっている。これまでの報告で、*Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株によって合成された P(3HB-co-6% 3HA)共重合ポリエステルが、LDPE と似た性質を有する丈夫でしなやかな素材であったのに対して¹⁰⁾、*R. eutropha* の組換え株によって合成された P(3HB-co-6% 3HA)共重合ポリエステルは、*Pseudomonas* sp. 61-3 の組換え株によって合成された共重合ポリエステルと同じモノマー組成を示すにも関わらず、分子量が低く、硬くて脆く実用性に乏しい素材であったことが報告されている¹¹⁾。分子量の違いは、機械的特性に影響をおよぼすといわれている。P(3HB)は一般的に、硬くて脆い素材であるが、超高分子量の P(3HB)においては、機械的性質が改善されると報告されている¹²⁾。本研究で合成された P(3HB-co-5.4% 3HA)共重合ポリエステルの数平均分子量 (M_n) は 233×10^3 であり、これまでに大腸菌組換え株でグルコースから、このように分子

量の比較的高い P(3HB-co-3HA)の合成は報告されていない。

P(3HB-co-5.4% 3HA)共重合ポリエステル融点 (T_m) およびガラス転移点 (T_g) はそれぞれ 161°C および 4.6°C であり、融解エンタルピー (ΔH_m) は 34.5 J/g であった (Table 5-17)。一般的に、中鎖長 3HA 分率が増加すると、P(3HB)ホモポリマーに比べて融点やガラス転移点の温度、融解エンタルピーが低くなるといわれている。このポリエステルのソルベントキャストフィルムを作製し (Fig. 5-3)、機械的特性を調べた結果、3週間エイジングしたフィルムにおける引張強度、ヤング率および破断伸びは、それぞれ 62 MPa、0.23 GPa および 195%であった。この破断伸び (195%) は、P(3HB)の破断伸び (5%) や、現在、PHAとして汎用されている P(3HB-co-20% 3HA)の破断伸び (50%) よりも高かった¹³⁾。しかしながら、5ヶ月間エイジングしたフィルムにおける引張強度、ヤング率および破断伸びは、それぞれ 55 MPa、0.20 GPa および 134%であった。したがって、この共重合ポリエステルは、長期間のエイジングによって機械的性質も変化すると考えられる。柘植らは、P(3HB-co-3HA)は一度、室温で1ヶ月以上エイジングされるとクロロホルムに溶解しなくなると報告している¹⁴⁾。この機械的性質の変化は、P(3HB-co-3HA)の二次結晶化が進むことによると考えられる。PHAの実用化において、共重合ポリエステルの結晶化による物性の変化を理解することも重要であるため、今後、共重合ポリエステルの結晶化についても検討する必要がある。

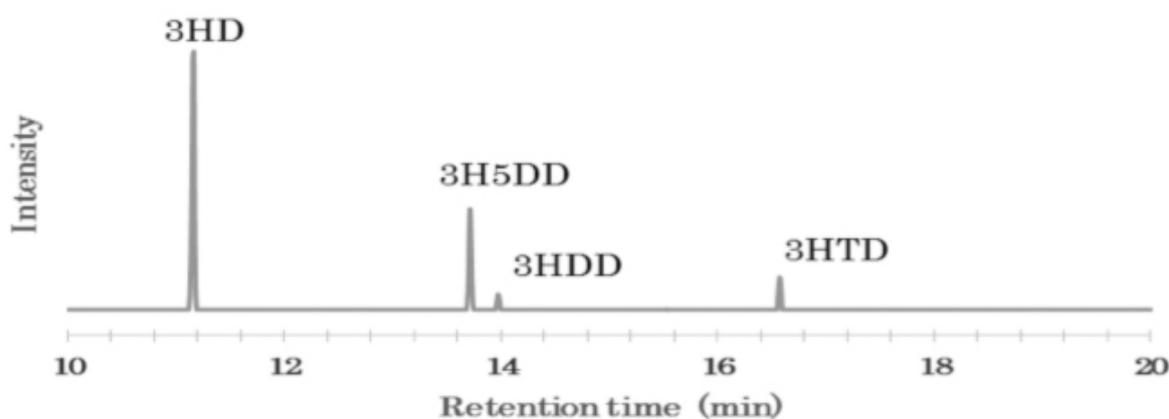


Fig. 5-1 GC/MS as trimethylsilyl derivatives of P(3HB-co-5.4% 3HA) synthesized by recombinant *E. coli* LS5218 harboring pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa).

3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate;

3H5DD, 3-hydroxy-*cis*-dodecanoate; 3HTD, 3-hydroxytetradecanoate

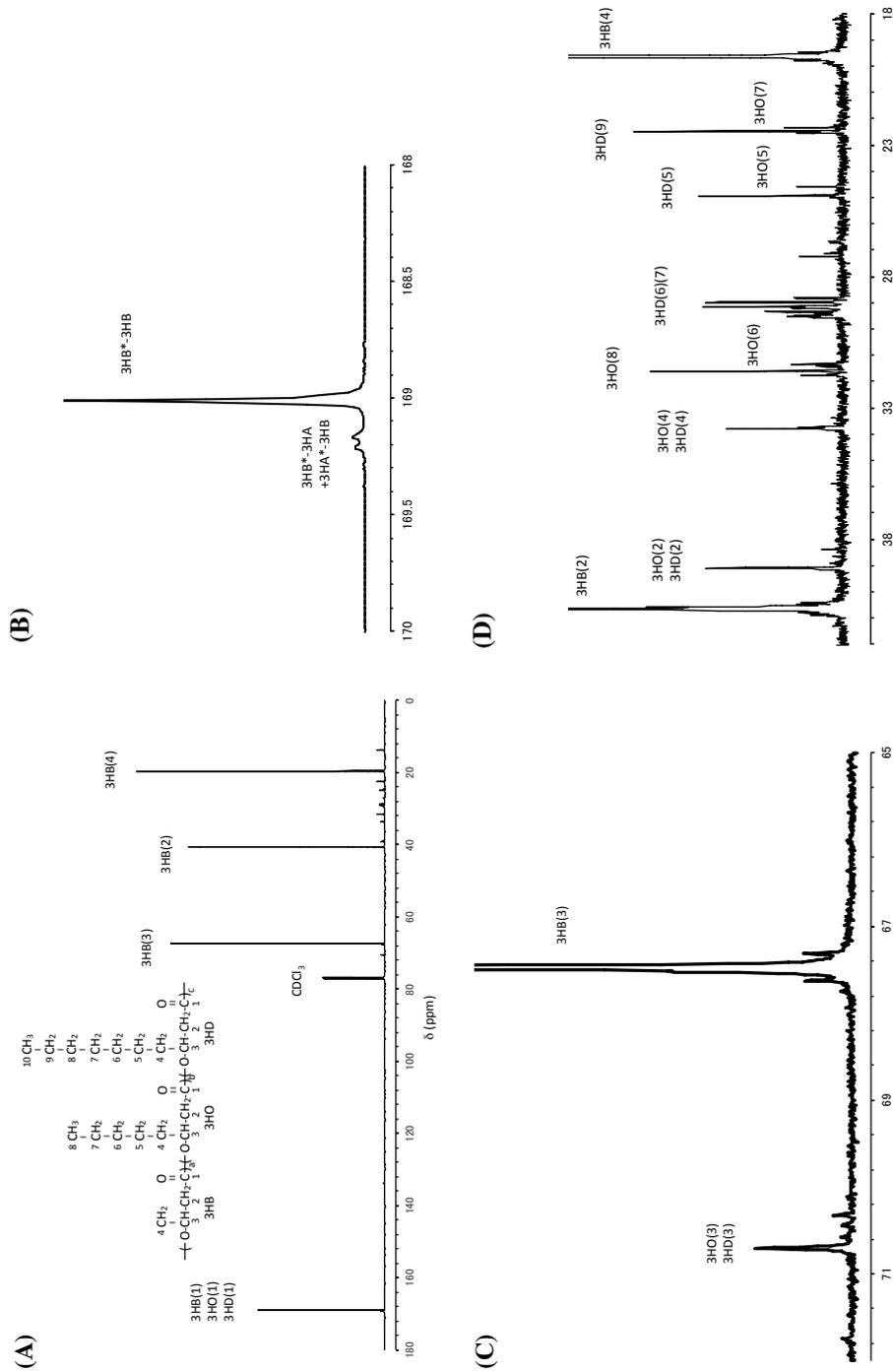


Fig. 5-2 125 MHz ^{13}C -NMR spectrum of P(3HB-co-5.4% 3HA) synthesized by recombinant *E. coli* LS5218 harboring pJScK-CIGAB and pRTcASc-MCL(Pa). (A) Full ^{13}C -NMR spectrum containing all detected peaks. (B) Expanded 168-170 ppm part of full spectrum. (C) Expanded 65-72 ppm part of full spectrum. (D) Expanded 18-42 ppm part of full spectrum. Carbon atoms in the copolymer are numbered and assigned to peaks in the spectrum. 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HA, mcl-3-hydroxyalkanoate.

Table 5-17 Molecular weights and thermal properties of solution-cast films of P(3HB-co-3HA).

sample	PHA composition (mol%)		Molecular weight		Thermal properties		
	3HB (C ₄)	3HA (C ₆ -C ₁₂)	M _n (x10 ³)	M _w /M _n	T _m (°C)	T _g (°C)	ΔH _m (J/g)
P(3HB-co-5.4% 3HA) ^a	94.6	5.4	233	2.0	161	4.6	34.5
P(3HB-co-6% 3HA) ^b	94	6	605	2.3	133, 146	-8	39
P(3HB-co-5 % 3HA) ^c	95	5	106	2.0±0.3	163.7±0.3	-3.0±0.1	37.1±0.9
P(3HB-co-7 % 3HA) ^c	93	7	96	1.7±0.2	163.8±0.1	-3.3±0.3	36.1±0.5
P(3HB-co-8 % 3HA) ^c	92	8	94	1.8±0.2	163.9±0.1	-2.9±0.2	31.7±0.4
P(3HB) ^d	100	0	650	1.8	178	4	91

PHA compositions were determined by ¹H-NMR. 3HB, 3-hydroxybutyrate; 3HA, medium-chain-length 3-hydroxyalkanoate units (C₆-C₁₂).

M_n, number-average molecular weight; M_w, weight-average molecular weight; T_m, melting temperature; T_g, glass-transition temperature; ΔH_m, enthalpy of fusion.

^aP(3HB-co-3HA) copolymer synthesized by *E. coli* LS5218 harboring pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa) in this study.

^bReference 10. ^c Reference 2. ^d Reference 15.



Fig. 5-3 本研究で作製した PHA フィルム (P(3HB-co-5.4% 3HB))

5-4 小括

これまで PhaG は、(R)-3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼとして、*Pseudomonas* 属細菌における脂肪酸合成経路を介した中鎖長 PHA の合成に重要であると報告されてきた¹⁶⁾。最近、PhaG は、(R)-3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ活性よりも、(R)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼ活性の方が高いことが報告された¹⁾。したがって、脂肪酸合成経路を介して中鎖長 PHA を合成するためには、(R)-3HA-CoA リガーゼが必要であるといえる¹⁾。*P. putida* KT2440 の PP0763 遺伝子の翻訳産物が(R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有するとの報告を受け¹⁾、本研究では、PP0763 遺伝子の翻訳産物とアミノ酸レベルで 82%の相同性を示した *P. aeruginosa* PAO1 の PA3924 遺伝子をクローニングした。そして、PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC1_{ps}*) およびモノマー供給系に関わる酵素遺伝子を大腸菌 (*E. coli* JM109 および *E. coli* LS5218) に導入した組換え株を作製し、グルコースを唯一の炭素源として、P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルの合成を試みた。

まず、30°C で培養した場合、*E. coli* JM109/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)では、炭素数 10 の 3HA ユニットが 1.7-1.8 mol%導入された P(3HB-co-3HA)が 7.8-8.8 wt%合成された。一方、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)では、炭素数 8 と炭素数 10 の 3HA ユニットが 6.2-7.0 mol%導入された P(3HB-co-3HA)が 5.3-7.2 wt%合成された。糖か

らの P(3HB-co-3HA)生合成においては、宿主として *E. coli* JM109 よりも、*E. coli* LS5218 を用いた方が、生育も良好で、より中鎖長 3HA ユニットも取り込みやすいと考えられた。次に培養温度を 25°C とした場合、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB が P(3HB)ホモポリマーのみを合成したのに対して、推定(R)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子を導入した大腸菌では中鎖長 3HA ユニットが導入された P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルが合成された。*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcKSc-MCL(Pp)は、炭素数 10 の 3HA ユニットが 2.3-2.6 mol% 導入された P(3HB-co-3HA)が 4 wt% 合成され、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)は炭素数 8 および 10 の 3HA ユニットが 5.1-7.1 mol%導入された P(3HB-co-3HA)が 20 wt%合成された。したがって、PA3924 遺伝子の翻訳産物も PP0763 遺伝子の翻訳産物と同様に(R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有することが明らかとなった。また、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)を 25°C で培養した際の PHA 生産量 (1.04-1.10 g/L) は、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcKSc-MCL(Pp)の PHA 生産量 (0.14-0.17 g/L) の約 7 倍であった。*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL(Pa)において、25°C で培養した場合、30°C で培養した場合に比べて、PHA 蓄積率は約 3-4 倍であった。さらに、37°C で培養すると、生育最適温度であるにも関わらず、PHA は合成されなかった。また、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB においては、30°C で培養した場合には PHA が合成されなかったのに対して、25°C で培養した場合には、P(3HB)ホモポリマーが合成された。したがって、培養温度を低くすると PHA の合成が増加した。これは、培養温度を低くし、菌体増殖と脂肪酸合成経路における代謝回転が抑制されることで、PHA 重合酵素の基質となる(R)-3HA-CoA の菌体内プール量が増加したことが考えられる。

¹H-NMR および ¹³C-NMR 解析によって、*E. coli* LS5218/pJScK-C1GAB and pRTcASc-MCL (Pa)が合成したP(3HB-co-3HA)の詳細なモノマー組成を調べた結果、3HB 分率が 96.4 mol%、炭素数 8 および 10 の中鎖長 3HA 分率が 5.4 mol%であった。また、本研究で合成された P(3HB-co-5.4% 3HA)は、短鎖長および中鎖長 PHA のブレンドではなく、3HB と中鎖長の 3HA からなる共重合ポリエステルであることが明らかとなった。さらに、TMS 化後の GC/MS より、この共重合ポリエステルには、わずかではあるが炭素数 12 および 14 の 3HA ユニットもポリエステル鎖に取り込まれていることが明らかになった。

また、P(3HB-co-5.4% 3HA)共重合ポリエステルの数平均分子量 (M_n) は 233×10^3 、多分散度 (M_w/M_n) は 2.0 であり、Tappel らが報告した大腸菌によって合成された P(3HB-co-3HA) の M_n より約 2 倍高かった。分子量の違いは、機械的特性に影響をおよぼすといわれてお

り、本研究で合成された P(3HB-co-5.4% 3HA)共重合ポリエステルは、比較的分子量が高い。これまでに大腸菌を宿主としてグルコースから、このような分子量の高い P(3HB-co-3HA)の合成は報告されていない。さらに、ソルベントキャストフィルムを作製し、機械的特性を調べた結果、3週間エイジングしたフィルムにおける引張強度、ヤング率および破断伸びは、それぞれ 62 MPa、0.23 GPa および 195%であった。これは、P(3HB)の破断伸び (5%) や、現在、PHA として汎用されている P(3HB-co-20% 3HA)の破断伸び (50%) よりも高く¹³⁾、実用的な PHA として期待される。しかしながら、長期間のエイジングによって機械的性質は変化した。この機械的性質の変化は、P(3HB-co-3HA)の結晶化が進むことによって起こると考えられるが、PHA の実用化において、こういった共重合ポリエステルの結晶化による物性の変化についても理解することが生分解性プラスチックの実用化と普及を考える上で重要になると思われる。

1. 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
2. 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 Sustainable Chem. Eng.*, **2**, 1879-1887
3. Taguchi, S. and Doi, Y. (2004) Evolution of polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by “enzyme evolution”: successful case studies of directed evolution. *Macromol. Biosci.*, **4**, 146-156
4. 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
5. 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
6. Davidson, J., Heusterspreute, M., Chevalier, N., Ha-Thi, V. and Brunel, F. (1987) Vectors with restriction site banks V. pJRD215, wide-host-range cosmid vector with multiple cloning sites. *Gene*, **51**, 275-280
7. 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
8. 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

9. 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
10. Matsusaki, H., Abe, H. and Doi, Y. (2000) Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, **1**, 17-22
11. Tsuge, T., Yamamoto, T., Yano, K., Abe, H. Doi, Y. and Taguchi, S. (2009) Evaluating the ability of polyhydroxyalkanoate synthase mutants to produce P(3HB-co-3HA) from soybean oil. *Macromol. Biosci.*, **9**, 71-78
12. Kusaka, S., Abe, H., Lee, S.Y. and Doi, Y. (1997) Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 140-143
13. Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, **25**, 1503-1555
14. Tsuge, T., Hamada, Y., Watanabe, Y., Tomizawa, S. Yamamoto, T. and Abe, H. (2010) Characterization of biosynthesized P(3HB-co-3HA)s swellable in organic solvents. *Polym. Degrad. Stab.*, **95**, 1345-1348
15. Abe, H., Doi, Y. and Kumagai, Y. (1994) Synthesis and characterization of poly[(R, S)-3-hydroxybutyrate- β -6-hydroxyhexanoate] as a compatibilizer for a biodegradable blend of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly(6-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, **27**, 6012-6017
16. Rehm, B.H.A., Kruger, 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

第六章

総括

プラスチックに代表される化石燃料由来の合成高分子材料は、軽くて強く、耐久性にすぐれるなどの利点をもっていることから、私たちの生活に欠かせない素材であるといえる。しかしながら、その廃棄物の多くは、自然環境中で分解されず、様々な環境問題を引き起こしている。一方、多くの微生物が、エネルギー貯蔵物質として菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は優れた生分解性を有し、環境調和型プラスチックとして期待されている。PHA の実用化のためには、PHA の物性を改善し、低コストで生産するシステムを構築することが重要である。したがって、PHA 生合成関連遺伝子の詳細な解析が必須であり、それにより得られた知見を基に、その分子構造や組成を自由にコントロールする必要がある。また、安価な炭素源を用いることが循環型社会構築のためにも好ましい。そこで、本研究では、ポリヒドロキシアルカン酸生合成遺伝子の解析と優れた共重合ポリエステル生産菌の分子育種を目的とした。

Pseudomonas sp. 61-3 は、炭素数 4 の 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) からなる P(3HB)ホモポリマーと、炭素数 4~12 の 3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) からなる P(3HB-co-3HA) 共重合ポリエステルの 2 種類の PHA を合成・蓄積する^{1,2)}。PHA 生合成に関する遺伝子について、P(3HB-co-3HA)の生合成に関わる *pha* locus と P(3HB)の生合成に関わる *phb* locus の一部がこれまでに同定されている。また、*Pseudomonas* sp. 61-3 の P(3HB)と P(3HB-co-3HA)の PHA 顆粒にはそれぞれ特異的に結合するタンパク質 Granule-associated protein (GAP) が存在する。PHA 顆粒にはポリエステル重合酵素以外に、GA18、GA36、GA24、GA48 (porin) が結合することが明らかとなっており、GA18 および GA36 の遺伝子は、*phal* および *phaF* とそれぞれ同定されているが³⁾、GA24 遺伝子は同定されていない。さらに、これらの GAP のポリエステルへの局在性が何に起因しているのかについては不明である。

そこで、第二章「*Pseudomonas* sp. 61-3 のポリヒドロキシアルカン酸顆粒結合タンパク質遺伝子のクローニングと顆粒結合タンパク質の局在性」では、GA24 遺伝子のクローニングを行い、*phbP* と命名した。さらに、*phbP* 遺伝子をプローブとして、本菌のゲノム DNA ライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションを行い、*phbP_{ps}* 遺伝子の周辺領域をクローニングした。その結果、*phbP* 遺伝子の下流に *phbF* 遺伝子を発見した。*phbP* 遺伝子の推定翻訳産物は、192 アミノ酸残基からなる推定分子量 20.4 kDa のタンパク質 (GA24)、*phbF* 遺伝子の推定翻訳産物は、178 アミノ酸残基からなる推定分子量 19.6 kDa のタンパク質であり、相同性検索の結果から、PhbP は P(3HB)や P(3HB-co-3HA)顆粒の安定性に関わる

phasin タンパク質、PhbF は *phbP* 遺伝子の転写を調節する調節タンパク質であると予想された。また、*Pseudomonas* sp. 61-3 の *phb* locus 上に *phbR* 遺伝子と *phbP* 遺伝子の間が約 3 kb 離れていることが明らかとなり、この間に機能不明 ORF を新たに見いだした。次に、GAP の局在性とポリエステルのモノマー組成比について、さまざまな共重合 PHA を合成する組換え株を作製し、検討した結果、これらの GAP は、PHB あるいは PHA 重合酵素との相互作用により局在性が決定するのではなく、ポリエステル鎖を直接認識し、モノマー組成比に応じて結合していることが予想された。これまでに PHA のモノマー組成の変化によって、PHA 顆粒の膜構造が変化するという報告があり⁴⁾、P(3HB-co-3HA)のモノマー組成比の変化により、PHA 顆粒の膜構造が変化し、それに伴い、PhbP、PhaI および PhaF タンパク質が特異的に結合している可能性も考えられた。

第三章「*Pseudomonas* sp. 61-3 のポリヒドロキシアルカン酸生合成遺伝子クラスター上に存在する機能不明遺伝子」では、第二章で新たに発見した、*Pseudomonas* sp. 61-3 の *phb* locus 上の *phbR* 遺伝子と *phbP* 遺伝子の間に存在する機能不明 ORF の機能解析を行った。RT-PCR により、この ORF の転写について調べたところ、LB 培地および MS 培地のいずれにおいても転写が確認されたため、この ORF は遺伝子として何らかの機能を有しており、構成的に発現していると考えられた。さらには、ORF の推定翻訳産物は、 α/β ヒドロラーゼドメインを有していることから、PHA 重合酵素あるいは菌体内 PHA 分解酵素であると予想した。そこで、*Pseudomonas* sp. 61-3 の ORF 破壊株および ORF 導入組換え株を作製するとともに、大腸菌の系を用いて、ORF の PHA 重合酵素活性および菌体内 PHA 分解酵素活性について検討したが、その機能を解明するまでには至らなかった。

第四章「組換え *Ralstonia eutropha* による PHA 生産」では、本研究や他の先行研究で得られた PHA 生合成遺伝子に関する知見を用いた応用例として、化学合成独立栄養細菌である *R. eutropha* を宿主として、糖や二酸化炭素から実用的な共重合 PHA の合成を試みた。*lac* プロモーターあるいは、*R. eutropha* の PHA 生合成遺伝子 (*phbCAB* オペロン) の native プロモーターの下流に、*Pseudomonas* sp. 61-3 の PHA 重合酵素遺伝子 *phaC1*、3-ヒドロキシシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 *phaG* および *R. eutropha* の β -ケトチオラーゼ遺伝子 *phbA*、アセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子 *phbB* を導入したプラスミドを作製し、PHA 合成能欠損株である *R. eutropha* PHB4 および *R. eutropha* C-TnGmHX8 に導入した。そして、これらの組換え株を従属栄養条件下あるいは独立栄養条件下にて培養した。その結果、*R. eutropha* C-TnGmHX8/pRKmKSc-C1GAB で、炭素数 6~12 の 3HA ユニットが 5

mol%程度導入された P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルが約 25 wt%合成された。そこで、この乾燥菌体からポリエステルの抽出し、GC/MS および NMR 解析を行ったところ、3HB 分率が 97.6 mol%、3HA 分率が 2.4 mol%で、中鎖長 3HA ユニットの取り込みはわずかであり、炭素数 10 以上の 3HA ユニットの取り込みはみられなかった。また、物性に関しては、破壊伸びが P(3HB)が 5%であるのに対して、このポリエステルは 23±3%であり、P(3HB)よりは、若干ではあるが、伸縮性のある素材であると考えられた。しかしながら、より物性の優れた PHA を合成するためには、さらに 3HA ユニットの割合を高める必要がある。また、二酸化炭素を炭素源として培養した場合、*R. eutropha* C-TnGmHX8/pRKmKSc-C1G で、約 60%の P(3HB)ホモポリマーが合成された。

一方、PhaG は、トランスフェラーゼ活性よりもチオエステラーゼ活性が高いことが最近報告された⁹⁾。したがって、中鎖長 3HA ユニットの供給するためには、PhaC1 および PhaG に加えて、(R)-3-ヒドロキシアシル CoA ((R)-3HA-CoA) リガーゼが必要である。また、大腸菌を宿主として糖から P(3HB-co-3HA)共重合ポリエステルの合成した報告例はほとんどない。そこで、第五章「大腸菌を宿主とした糖からの生分解性共重合ポリエステルの生合成～(R)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子のクローニング～」では、*P. aeruginosa* PAO より推定中鎖長アシル CoA リガーゼ遺伝子 (PA3924) をクローニングし、PHA 重合酵素遺伝子とともにモノマー供給系に関わる酵素遺伝子を導入した大腸菌の組換え株を作製し、糖を炭素源として培養した。その結果、PA3924 遺伝子導入株で中鎖長 3HA ユニットの 5.4 mol%導入された P(3HB-co-3HA)が合成され、PA3924 遺伝子の翻訳産物が (R)-3HA-CoA リガーゼ活性を有することを初めて明らかにした。このポリエステルの数平均分子量 (M_n) は 233×10^3 、多分散度 (M_w/M_n) は 2.0 であり、このように比較的分子量の高い共重合ポリエステルを大腸菌を宿主として糖から合成した例はなく、本研究が初めての報告である。このポリエステルのソルベントキャストフィルムを作製し、機械的特性を調べた結果、3 週間エイジングしたフィルムにおける破断伸びは 195%であり、P(3HB)に比べて物性が改善された。脂肪酸合成経路はすべての生物において共通であるので、今後、本研究で確立した大腸菌における糖からの共重合ポリエステルの生合成の系を応用し、*R. eutropha* を宿主として二酸化炭素からの共重合ポリエステルの生合成も可能であると考えられる。これに成功できれば、高度環境調和型 PHA 生産システムの構築にさらに寄与できるといえる。また、目的とするモノマー組成の共重合 PHA を効率よく合成するためには、PHA 重合酵素やモノマー供給系に関わる酵素だけでなく、PHA 顆粒の安定化に寄

与する phasin を共発現させる必要があるかもしれない。

以上、本研究では、安価な糖や二酸化炭素から実用的な生分解性共重合ポリエステルを合成するために、まず、PHA 生合成遺伝子の解析を行った。各酵素の特性・特徴について明らかにし、代謝制御を行うことは、優れた物性の PHA の合成と効率的生産につながるといえる。さらに、本研究では、これらの知見に基づいて微生物の分子育種を行った。遺伝子組換え菌を作製し、物性の優れた共重合ポリエステルの合成を効率的に行うことで、より環境にやさしい PHA 生産、物性の改善と低コスト化が可能となるといえる。

1. 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
2. Fukui, T., Kato, M., Matsusaki, H., Iwata, T. and Doi, Y. (1998) Morphological and ¹³C-nuclear magnetic resonance studies for polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas* sp. 61-3. *FEMS Microbiol. Lett.*, **164**, 219-225
3. Matsumoto, K., Matsusaki, H., Taguchi, K., Seki, M. and Doi, Y. (2002) Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, **3**, 787-792
4. Mayer, F., Madkour, M.H., Pieper-Fürst, U., Wieczorek, R. and Steinbüchel, A. (1996) Electron microscopic observations on the macromolecular organization of the boundary layer of bacterial PHA inclusion bodies. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **42**, 445-455
5. 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

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) 500 mg を量り取り、滅菌水 10 mL を入れ、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 を入れ、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 を入れ、ボルテックスで溶解させる。

- ・ ゲンタマイシン (Gm) (10 mg/mL)

遠沈管にゲンタマイシン硫酸塩 100 mg を量り取り、滅菌水 10 mL を入れ、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 μ m) し、滅菌済み遠沈管 (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 mL ずつ分注しておく。

【誘導物質】

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

フィルター滅菌 (0.2 μ m) を行い、滅菌済み遠沈管 (15 mL 容) で-25°C で保存する。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子発現の誘導物質として使用する。

【発色性基質】

- ・ X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-b-D-ガラクトピラノシド)

β -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-ブロモ-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%

・MS (Mineral salt) 培地

<炭素源が糖の場合>

Table A-4 の成分のうち、1000 × MgSO₄ soln.、Trace element soln.、炭素源 (20%濃度に調製し、フィルター滅菌したもの) を除いた 100 mL 分の成分を、500 ml 容坂口フラスコ 1 本あたり 90 mL の蒸留水に溶解させ、pH 7.0 に調整後、121°C で 20 分間オートクレーブ殺菌を行う。培養直前に 1000 × MgSO₄ soln.、Trace element soln.をそれぞれ 100 μL、炭素源を 10 mL (終濃度 2%) 添加する。また、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。

<炭素源が脂肪酸の場合>

炭素源が糖の場合と同様にして坂口フラスコ 1 本あたり 90 mL の蒸留水に溶解させ、pH 7.0 に調整する。脂肪酸の場合は、オートクレーブする前に必要量の脂肪酸 (それぞれ終濃度 0.5%) を添加し、さらに蒸留水を 10 mL 加える。脂肪酸は完全には溶解しないため、粉末が残っている状態で良い。その後は炭素源が糖の場合と同様にオートクレーブする。

Table A-4

Mineral salt medium (1 L)		^(b) Trace element soln. (0.1 N HCl)	
KH ₂ PO ₄	1.5 g	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.218 g/L
NaHPO ₄ · 12H ₂ O	9.0 g	FeCl ₃	9.7 g/L
NH ₄ Cl	0.5 g	CaCl ₂	7.8 g/L
1000 × MgSO ₄ soln. ^(a)	1 mL	NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.118 g/L
Trace element soln. ^(b)	1 mL	CrCl ₃ · 6H ₂ O	0.105 g/L
Carbon source	x g	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.156 g/L

^(a) 1000 × MgSO₄ soln. . . . MgSO₄ · 7H₂O 200 g/L

・ シモンズ・クエン酸培地

下記成分 (Table A-5) に蒸留水を加えて 500 mL とし、pH を 6.9 に調整する。褐変を防ぐため、Agar は別に量り取り、500 mL の蒸留水を加えて調製する。それぞれ調製後、121°C、20 分オートクレーブ殺菌を行う。オートクレーブ後、別殺菌した Agar、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、混合して滅菌シャーレに 15~20 mL 注ぎ、寒天平板培地を作製する。

Table A-5

Simmond's citric acid Medium (1 L)	
クエン酸三ナトリウム二水和物	2.3 g
NaCl	5.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Agar	15.0 g

・ SOB 培地

Bacto Tryptone (Difco) ...終濃度 2.0%、Yeast extract (Difco) ...0.5%、NaCl...10 mM、2 M KCl...2.5 mM となるように蒸留水に溶解し、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 Mg²⁺溶液 (1 M MgSO₄ · 7H₂O + 1 M MgCl₂ · 6H₂O) を加える。

・SOC 培地

SOB 培地 (2 M Mg^{2+} が入っていないもの) (1 サンプルにつき 200 μ L 使用) に、オートクレーブした 2 M Mg^{2+} 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 μ L) ずつ加える。

Appendix-2 protocols

【ゲノム DNA の少量調製】

・ 試薬

1) TE (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)

※ pH 調整後、オートクレーブする。

2) 20 mg/mL proteinase K

3) 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

3) 10%SDS

ドデシル硫酸ナトリウムを 10% (w/v) になるように超純水に溶解し、オートクレーブ殺菌を行う (フィルター滅菌をしてもよい)。

4) CTAB-NaCl

5) 5 M NaCl

6) クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1)

7) TE 飽和フェノール

8) イソプロパノール

9) 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 μ l の TE に懸濁する。
- 4) これに 30 μ L の 10%SDS および 3 μ 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 μ L 加えて穏やかによく混和する。
- 7) CTAB-NaCl を 80 μ 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 μ L 加え約 10 分間チューブを上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（ \sim 650 μ 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 μ L に溶解する（約 10 \sim 20 μ g の DNA が得られる）。
- 19) 100 μ 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
- 1) TE

2) 10 mg/mL RNaseA (DNase free)

		最終濃度
Ribonuclease A bovine pancreas (RNaseA)	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RNaseA 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。

3) クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1)

4) TE 飽和フェノール

5) 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)

6) 100%冷エタノール

・ 操作

- 1) 上記で得られた 100 μ L の DNA 溶液に TE (pH 8.0) 100 μ L をさらに加える。
- 2) 10 mg/mL の RNase (DNase free) を 2 μ 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 μ 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 μ 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。

【アガロース電気泳動】

・試薬

1) 電気泳動用低沸点アガロース LO3 (TaKaRa)

2) 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。

3) 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。

4) 分子量マーカー Loading Quick *λ*HindIII digest (TOYOBO)

5) 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 μ L に色素 2 μ L を混合し、ウェルにアプライする。

2) 10 μ 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 15 min 穏やかに振とう洗浄する。

4) UV (短波長 254 nm) でバンドを確認し、写真を撮る。

【ゲルからの DNA 抽出】

GENECLEAN KIT (BIO 101) 使用あるいは QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いた。

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

・試薬

Ligation high Ver.2 (TOYOBO)

・操作

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

【形質転換】

・試薬

- 1) LB (AXI) 寒天培地
- 2) SOB 培地
- 3) 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 μL 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

- 1) LB 試験管培地
- 2) FlexiPrep Kit (GE Healthcare)
- 3) 2-プロパノール (関東化学)
- 4) 5 M NaCl
- 5) 100%冷エタノール
- 6) 70%冷エタノール
- 7) 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 μ L 加え、ピペッティングにより懸濁する。
- 5) Solution II を 200 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 mL 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 μ L の TE を加え、ボルテックスにより懸濁し、1 min 毎にボルテックスにかけながら室温で 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 μ 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。
- 29) 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 IR² System, LIC4200L 使用 (LI-COR)]

・試薬

- 1) Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB)
- 2) IRD800-labeled primer (M13 Forward、M13 Reverse) (日清紡)
- 3) IR² Stop Solution (LI-COR)
- 4) KB^{Plus}3.7% Gel Matrix (LI-COR)
- 5) KB^{Plus}5.5% Gel Matrix (LI-COR)
- 6) 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。
- 7) TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine) (Bio-Rad)
- 8) 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。
- 9) 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 ^{Plus} Gel Matrix	3.7% 40 mL	5.5% 30 mL
10% APS	230 μ L	200 μ L
TEMED	23 μ L	20 μ L
泳動用 buffer	0.8 \times TBE	0.8 \times 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

Component	Volume (μ L)
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 μ L 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 μ L ずつ分注する。
- 3) 1) で調製したマスターミックスを 2.0 μ L 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 IR² Stop Solution を 2.0 μ L 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 μ L 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。

【プラスミドの単離 (アルカリ SDS 法)】

・ 試薬

1) 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。

2) Solution II 試験管 (1.5 mL) 1 本分

0.2 N NaOH	8 μ L
10% SDS	20 μ L
滅菌水	172 μ L

計 200 μ L

使用時に調製する。

3) 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 μ L の Solution I に懸濁して室温で 5 分間放置する。
- 4) 200 μ 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 μ 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。
※ 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 回行った方が良い。
- 7) 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。
- 8) 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。
- 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、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⁺などの場合は 20 μ L に溶解させると良い。

【RNA 除去および制限酵素処理】

・ 試薬

- 1) 10 mg/mL RNase A (DNase free)
- 2) 制限酵素

- 3) 10 × buffer
- 4) 3 M NaOAc
- 5) 100%冷エタノール
- 6) 70%冷エタノール

・操作

- 1) プラスミド溶液を数 μL とり、滅菌水を加えて 19 μL にする。
- 2) 10 mg/ml RNase を 1 μL 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 μL 添加し、滅菌水 169 μL を加え、これに制限酵素を各 1 μL 加えて、穏やかに混和する (計 200 μL)。
- 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 μL と、500 μL 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。

【ゲノム DNA の場合】

- 1) *Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA について制限酵素処理を行う。下記をマイクロチューブに入れ、400 μL スケールで各制限酵素の最適温度で制限酵素処理を一晩行う。

ゲノム DNA	10 μg 程度
10 × buffer	40 μL
制限酵素	5 μL
滅菌水	Up to 400 μL

- 2) 反応後、1/10 倍量 (40 μL) の 5 M NaCl と 2.5 倍量 (1 mL) の 100%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 (エタノール沈殿)。
- 3) 真空遠心乾燥機で約 15 分間沈殿物を乾燥させ、8 μL の滅菌水に溶解する。全量を電気泳動用サンプルとする。

【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）】

[CIAP (TOYOBO)]

・試薬

- 1) 10 × buffer
- 2) CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)
- 3) 3 M NaOAc
- 4) 100%冷エタノール
- 5) 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 μL に溶解した後、5 μL の 10 × buffer、1 μL 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 μL にし、等量（約 200 μL ）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 μL に溶解した後、20 μL の 10 × CIAP buffer、10 μL 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 μL ）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 μL) の 3 M NaOAc と 2.5 倍量 (500

- μL) 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、ライゲーシオンに用いる。

【標識プローブ作製】

[Gene Images CDP-Star Detection Kit (GE Healthcare) 使用]

・ 試薬

- 1) Nucleotide mix
- 2) Primer solution
- 3) 酵素溶液 (Klenow)
- 4) 0.5 M EDTA

・ 操作

- 1) それぞれのプローブ用 DNA 断片を 100°C で 5 分間熱変性後、ただちに 5 分間氷冷 (2 本鎖の DNA 断片を 1 本鎖にした後、2 本鎖に戻らないようにするため)。
- 2) 氷上で、熱変性 DNA に下記の試薬を加える (Klenow は必ず最後に加え、失活しやすいので優しくピペッティングする)。

Nucleotide mix	10 μL
Primer solution	5 μL
酵素溶液 (Klenow)	1 μL
滅菌水	Up to 50 μL

- 3) 37°C で 1~4 時間または室温で一晩インキュベーションを行う (37°C でのインキュベーションは最大 4 時間まで)。
- 4) 最終濃度 20 mM になるように EDTA を加え (反応溶液 50 μL に対して 0.5 M EDTA ストック溶液を 2.1 μL 添加)、反応を停止させる。
- 5) -20°C で遮光保存 (6 ヶ月間安定)。

[DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche) 使用]

・ 試薬

- 1) Hexanucleotide Mix
- 2) dNTP Mix
- 3) 酵素溶液 (Klenow)
- 4) TE

・ 操作

- 1) プローブ用 DNA 断片を熱変性後、ただちに 5 分間氷冷 (2 本鎖の DNA 断片を 1 本鎖にした後、2 本鎖に戻らないようにするため)。
- 2) 氷上で、熱変性 DNA (約 1 μg) に下記の試薬を加える (Klenow は必ず最後に加え、失活しやすいので優しくピペッティングする)。

Nucleotide mix	10 μL
Primer solution	5 μL
酵素溶液 (Klenow)	1 μL
滅菌水	Up to 50 μL

- 3) 37°C で 20 時間インキュベーションを行う。
- 4) 最終濃度 20 ng/ μL になるように TE を加え、反応を停止させる。上述のように作製したプローブを用いて、電気泳動、DNA トランスファーおよびサザンハイブリダイゼーションを行う。

【標識プローブの取り込み効率チェック】

・ 試薬

- 1) hybridization buffer (0.125 mL/cm²)

20 × SSC	50 mL
デキストラン硫酸 (SIGMA)	10 g
blocking 試薬 (全量の 1/20 量)	10 mL
10%SDS	2 mL
超純水	Up to 200 mL

上記を耐圧ビンに入れ、ウォーターバスで 60°C に加温しながら溶かし、メスシリンダーに移して 200 mL にメスアップする。再び耐圧ビンに戻してスターラーバーを入れたままオ

オートクレーブする。-28°Cで12ヶ月安定。

2) buffer A (pH 9.5)

Tris	0.1 M	18.17 g
NaCl	0.3 M	26.3 g
超純水		Up to 1.5 L

Tris と NaCl を約 1.4 L の超純水に溶かし、濃 HCl で pH 9.5 に調整後 1.5 L にメスアップし、オートクレーブする。

3) 標識プローブ

加えた buffer に対して 5~10 ng/mL のプローブ溶液をマイクロチューブに取り、これに 20 μ L 以上 (通常は 20 μ L でよい) となるよう滅菌水を加えたものを使用する。

4) 1 次洗浄 buffer (2~5 mL/cm²)

20 × SSC	7.5 mL
10%SDS	1.5 mL
超純水	Up to 150 mL

5) 2 次洗浄 buffer (2~5 mL/cm²)

20 × SSC	0.75 mL
10%SDS	1.5 mL
超純水	Up to 150 mL

6) blocking 用試薬 (0.75~1 mL/cm²)

buffer A	90 mL
blocking 試薬 (全量の 10%)	10 mL
	計 100 mL

7) 希釈抗体溶液 (0.3 mL/cm²)

BSA (0.5% (w/v)) (SIGMA-ALDRICH®)

buffer A

AP 標識フルオレセイン抗体 (GE Healthcare: 全量の 0.02%)

あるいは

AP 標識抗フルオレセイン、Fab フラグメント (Roche: 全量の 0.01%)

8) 0.3% (w/w) Tween 20 含有 buffer A (2~5 mL/cm²)

Tween 20	1.35 mL
buffer A	Up to 450 mL

9) 検出試薬 : CDP-Star (Gene Images, GE Healthcare)

・ 操作

- 1) 作製した標識プローブの $10^1 \sim 10^8$ 希釈を用意する。
- 2) 実験台、ハサミ、ピンセットをエタノール消毒後、手袋を着用してナイロンメンブレン (Hybond-N⁺, GE Healthcare) を準備し (右上角を切っておく)、標識プローブの原液、 $10^1 \sim 10^8$ 希釈液をそれぞれ $1 \mu\text{L}$ ずつスポットする。
- 3) $2 \times \text{SSC}$ (DNA transfer (ナイロン膜への転写) 参照) で5分間振とうする。
- 4) Blotting paper をメンブレンよりも少し大きめに切ったものを3枚準備する。1枚の上にメンブレンをのせて水分を除いたら、新たな blotting paper の上で風乾後、残りの1枚をのせてメンブレンをはさみ、アルミホイルで軽く包んで 80°C 、120分間 baking により固定する。
- 5) Hybridization buffer 中で 68°C 、一晩インキュベートする。
- 6) 1次洗浄 buffer ($2 \sim 5 \text{ mL/cm}^2$) で 68°C 、15分間 $\times 2$ 回振とうする。1次洗浄 buffer、2次洗浄 buffer ともあらかじめ 68°C に加温してから用いる。
- 7) 2次洗浄 buffer ($2 \sim 5 \text{ mL/cm}^2$) で 68°C 、15分間振とうする。
- 8) Buffer A で5分間洗浄する (2 mL/cm^2 以上)。
- 9) 室温で、blocking 試薬中で60分間 blocking を行う ($0.75 \sim 1 \text{ mL/cm}^2$)。
- 10) Buffer A で5分間洗浄する。
- 11) メンブレンをハイブリバックに移し、室温で60分間穏やかに振とうし、希釈抗体溶液と反応させる (0.3 mL/cm^2)。
- 12) 0.3% (w/w) Tween 20 含有 buffer A で10分間 $\times 3$ 回洗浄する ($2 \sim 5 \text{ mL/cm}^2$)。
- 13) Buffer A で5分間洗浄する。
- 14) 平らな場所に敷いたサランラップの上に、buffer A をある程度除いたメンブレンをブロット面を上にして置く。
- 15) 検出試薬 (CDP-Star) を全体に均一に滴下後 ($1 \sim 1.5 \text{ mL}$ 程度)、ラップを四方に傾けてさらに均一化させて2~5分間放置する。
- 16) Blotting paper で余分な検出試薬を除き、そのままラップに包んで 37°C で10分程度インキュベートしてから化学発光を化学発光測定機 (ルミノ・イメージアナライザー LAS-1000plus、富士写真フイルム) で検出する。

【サザンハイブリダイゼーション電気泳動】

- ・ 試薬
 - ・ SeaKem GTG Agarose (CAMBREX)
 - ・ 1 × TAE buffer
 - ・ EtBr ストック溶液
 - ・ 分子量マーカー Illuminator Nonradioactive Lambda/*Hind*III Marker (Stratagene)
 - ・ 色素 Loading Dye (TOYOBO)

- ・ 電気泳動装置

15 cm × 16 cm : SUB-CELL GT (Bio-Rad)

- ・ 操作

制限酵素処理済のゲノム DNA 溶液 8 μ L に、色素 2 μ L を混合したものをサンプルとして、ゲルのウェルにアプライし、30 V で 12 時間電気泳動を行う。制限酵素処理済のプラスミド (pLA2917) を用いるときは、反応液 (200 μ L) から 1/20~1/50 量を取り出し色素を加えて電気泳動用サンプルとする。また、サンプルと同時に分子量マーカー (Illuminator Nonradioactive Lambda/ *Hind*III Marker; STRATAGENE) もゲルのウェルにアプライする。EtBr に 30 分間振とう染色後、蒸留水で 30 分間緩やかに振とう洗浄する。UV (長波長 365 nm) でバンドを確認する (次の DNA トランスファーへ移る)。

【DNA トランスファー (ナイロン膜への転写)】

- ・ 試薬

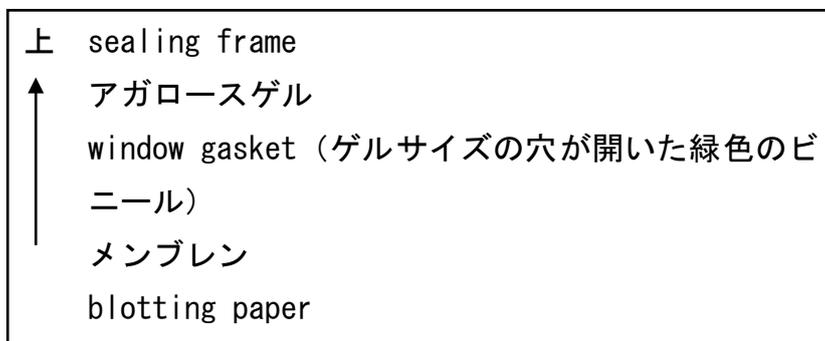
- 1) 0.25 N HCl (超純水で調製する。)
- 2) 0.5 N NaOH (超純水で調製する。)
- 3) 20 × SSC ストック溶液 1 L (pH 7.0)

NaCl	333 mM	175.3 g
クエン酸 3Na 二水和物	333 mM	88.2 g
超純水		Up to 1 L

※ pH 調整後、オートクレーブする。

・操作

- 1) 0.25 N HCl で 15 分間振とうする。
- 2) 超純水で 5 分間 ×2 回洗浄する。
- 3) 0.5 N NaOH で 30 分間振とうする。
- 4) ゲルより少し大きめにナイロンメンブレン (Hybond-N⁺, GE Healthcare) を、ナイロンメンブレンよりも少し大きめに blotting paper を切る。
※ ハサミ、プラスチック製ピンセットはエタノール消毒してから使用する。
※ メンブレンは目印として、右上角を切っておく。
- 5) トレーに超純水を入れ、blotting paper→メンブレンの順にひたす。
- 6) 同様に 10×SSC にひたす (20×SSC ストック溶液を希釈して用いる)。
- 7) 吸引装置 (VACCUM BLOTTER (Bio-Rad)) をセットする。以下のように順に気泡が入らないよう空気を抜きながらのせていく。



- 8) Sealing frame をセットし、真空ポンプの黒いボルト型のねじが緩んでいることを確認してからスイッチを ON にする。
- 9) ねじをゆっくり締めながらメーターを 2~3 in Hg 程度にし、ゲルが動かないように固定する。このとき、ゲルのレーンにシャープペン等で印をつけておく。
- 10) 10×SSC をゲル表面が浸るくらいまで注ぎ、7 in Hg で 90 分間吸引する。
※ ゲルが乾かないよう、10×SSC の量の変化に注意する。
- 11) トランスファー後、メンブレンを 2×SSC で 5 分間振とうする。
- 12) Blotting paper をメンブレンよりも少し大きめに切ったものを 3 枚準備する。1 枚の上にメンブレンをのせて水分を除いたら、新たな blotting paper の上で風乾後、残りの 1 枚をのせてメンブレンをはさみ、アルミホイルで軽く包んで 80°C、120 分間 baking により固定し、化学発光法による検出操作を行う。
- 10) Baking 後はこのままの状態でも長期保存可。

11) ゲルは EtBr で再染色 (15 分間) し、UV で DNA のメンブレンへの転写を確認する。

【Southern hybridization 検出 (化学発光法)】

・ 試薬

【標識プローブの取り込み効率チェック】参照。

・ 操作

- 1) Hybridization オープンと hybridization buffer を 68°C に、ヒートブロックを 100°C にあらかじめ加温しておく。
- 2) メンブレンをハイブリバックに入れ、hybridization buffer (0.125 mL/cm²) を加えて封をし、オープン内で 68°C、30 分間の prehybridization を行う。
- 3) 標識プローブを 100°C、5 分間熱変性させ、すぐに氷冷する。
(プローブが 2 本鎖に戻らないように、少し長く熱変性してもよい。)
- 4) Prehybridization したハイブリバックの一部を切り、熱変性したプローブをメンブレンに直接かからないよう buffer 中にマイクロピペットで加える。
- 5) 再び封をしてオープン内で 68°C、overnight でインキュベートする。
※ ハイブリダイゼーション温度は、60~68°C で行うのが基本である。温度が低いと非特異的結合が行われる場合があるので、そのときには温度を上げる必要がある。また、高い温度からやってみてシグナルが見られない場合は、温度を下げてやってみるとよい。
- 6) 1 次洗浄 buffer (2~5 mL/cm²) で 68°C、15 分間×2 回振とうする。1 次洗浄 buffer、2 次洗浄 buffer ともあらかじめ 68°C に加温してから用いる。
- 7) 2 次洗浄 buffer (2~5 mL/cm²) で 68°C、15 分間振とうする。
- 8) Buffer A で 5 分間洗浄する (2 mL/cm² 以上)。
- 9) 室温で、blocking 試薬中で 60 分間 blocking を行う (0.75~1 mL/cm²)。
- 10) Buffer A で 5 分間洗浄する。
- 11) メンブレンをハイブリバックに移し、室温で 60 分間穏やかに振とうし、希釈抗体溶液と反応させる (0.3 mL/cm²)。
- 12) 0.3% (w/w) Tween 20 含有 buffer A で 10 分間 ×3 回洗浄する (2~5 mL/cm²)。
- 13) Buffer A で 5 分間洗浄する。

- 14) 平らな場所に敷いたサランラップの上に、buffer A をある程度除いたメンブレンをブロット面を上にして置く。
- 15) 検出試薬 (CDP-Star) を全体に均一に滴下後 (1~1.5 mL 程度)、ラップを四方に傾けてさらに均一化させて2~5 分間放置する。
- 16) Blotting paper で余分な検出試薬を除き、そのままラップに包んで37°C で10 分程度インキュベートしてから化学発光を化学発光測定機 (ルミノ・イメージアナライザー LAS-1000plus、富士写真フイルム) で検出する。

【ゲノム DNA ライブラリーの作製 (*Pseudomonas* sp. 61-3 の場合)】

・操作

- 1) 反応液 500 μ L 中のゲノム DNA 150 μ g に *Sau*3AI (1 \times M buffer で30 倍希釈したもの) を1 μ L 加える。37°C に設定しておいたヒートブロックにて反応させ、3、6、9、12、15、20、25、30、40、50 分毎に50 μ L ずつ抜き取り、前もって、5 μ L の0.5 M EDTA (pH 8.0) と2.5 μ L の10%SDS を入れておいたマイクロチューブに移し、氷上に保存しておく。

10 \times M buffer	50 μ L
ゲノム DNA	150 μ g
<i>Sau</i> 3AI (30 倍希釈)	1 μ L
滅菌水	up to 500 μ L

- 2) 各々より7.5 μ L ずつとり、アガロースゲルにて電気泳動を行い、切断の程度 (サイズ) を調べる。
- 3) チューブの残り (50 μ L) に滅菌水 150 μ L を添加し、等量 (200 μ 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、よく混和する (フェノール処理)。
- 4) 12,000 rpm で5 分間遠心する。
- 5) 上層を新しいチューブに移し、もう一度フェノール処理を行う。
- 6) 上層を新しいチューブに移し、エタノール沈殿を行う。
- 7) 真空遠心乾燥後、10 μ L の滅菌水に溶解し、-20°C にて冷凍保存する。

【プレーティングセルの調製】

- 1) 宿主 *E. coli* S17-1 を 0.2% マルトース含有 LB 培地 1.5 mL に接種し、30°C にて一晩培養する。

0.2% マルトース含有 LB 培地 (1 L)	
Bacto Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.5 g
マルトース	2 g

※ 蒸留水を加えて 1L とし、pH7.0 に調整した後、121°C、20 分オートクレーブ殺菌を行う。

- 2) 全量を低速遠心 (4°C、3,500 rpm、10 分) する。
- 3) 上清を捨て、集菌した菌に、1 mL の 10 mM MgSO₄ を加えてピペッティングする。この状態で、4°C、2 週間安定。

【pLA2917 (コスミドベクター) の調製】

- 1) 約 2 μg の pLA2917 を *Bg*III で切断する。37°C で一晩処理を行う。

pLA2917	2.0 μg
H × buffer	40 μL
<i>Bg</i> III	1 μL
滅菌水	Up to 400 μL

- 2) *Bg*III で切断した pLA2917 をアルカリフォスファターゼ処理する。
- 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) 処理を行い、真空遠心乾燥させる。

【ライゲーション、パッケージングおよび形質導入】

- 1) ゲノム DNA の部分消化による DNA 断片のサイズ分布の中心が 10~20-kb にあるチューブを選択する。
- 2) アルカリフォスファターゼ処理した pLA2917/*Bg*III の乾燥物に、ゲノム DNA/*Sau*3AI 溶液 10 μL のうち 2 μL を加え、溶解させる。
- 3) 1 μL の Ligation High (TOYOBO) を加える (計 3 μL となる)。
- 4) 16°C、一晩ライゲーションする。

- 5) ライゲーション産物 3 μL をインビトロパッケージングする。インビトロパッケージングには、Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) を用いる。ライゲーション産物 3 μL に packaging extract 25 μL を加える。その後、室温 (22°C) にて、2 時間放置する。

※ Packaging extract を加えた後、ゆっくりピペッティングする。泡が生じたら、スピンドアウンをして泡をなくす。激しくすると、形質導入効率が落ちる。

- 6) SM buffer を 500 μL 加え、ピペッティングする。その後、大腸菌などの混雑物が増殖しないように 20 μL のクロロホルムを加え、おだやかに混和する。4°C で 1 ヶ月保存可能。

SM buffer (1 L)	
NaCl	5.8 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.0 g
1M Tris-HCl (pH 7.5)	50 mL
2% gelatin	5 mL

※ 121°C、20 分オートクレーブ殺菌を行う。

- 7) サンプルを 10 μL (10 倍希釈) および 25 μL (4 倍希釈) とって SM buffer で 100 μL に希釈する。これにプレーティングセル 100 μL を加え、30 分間室温 (22°C) で放置する。その後、LB 培地 800 μL を加える。
- 8) ヒートブロックにて、37°C、1 時間インキュベーションを行う。15 分毎にボルテックスにかける。
- 9) 6,000 rpm、3 分間遠心して、上清を捨て、菌体ペレットを 100 μL の LB 培地に懸濁する。
- 10) サンプル全量を LB (Tc) プレートにプレーティングする。37°C、一晚培養し、明朝コロニー数を数える。

※ 微生物のゲノムのサイズから考えて、DNA 挿入断片を有する遺伝子ライブラリーから 99%の確率で目的遺伝子を得るためには、5000 個以上のコロニーが必要である。したがって、5000 個に満たない場合は、やり直した方が良い。

- 11) 形質導入した残りのサンプルからクロロホルムを取り除く (スピンドアウンを行い、クロロホルムを下に落とす)。その後、1 サンプルにつき 100 μL になるように SM buffer を加える。その後、プレーティングセル 100 μL を加え、30 分間室温 (22°C) にて放置する。その後、LB 培地 800 μL を加える。

- 12) 8)、9)、10)の操作を行う。
- 13) コロニーを形成したプレートにLB培地を1 mL加えて、各プレートのコロニーをかき集め、1つにまとめる。
- 14) 集めた菌体懸濁液全量に対して、15%グリセロール濃度になるように60%グリセロールを加える。
- 15) ボルテックスでよく混ぜる。
- 16) セラムチューブに分注し、-80°Cにて冷凍保存する。

(*Pseudomonas* sp. 61-3 ゲノムDNAライブラリーの完成)

【コロニーハイブリダイゼーション】

・試薬

1) 変性溶液 (メンブレン1枚分)

5 N NaOH (0.5 N NaOH)	0.1 mL
5 M NaCl (1.5 M NaCl)	0.3 mL
滅菌水	0.6 mL
	計 1 ml

2) 中和溶液 (1 M Tris-HCl (pH 7.5))

3) 50 mM NaOH-0.1%SDS 溶液

5 N NaOH	1 mL
10%SDS	1 mL
超純水	98 mL
	計 100 mL

・操作 (手袋を着用し、エタノール消毒したピンセットを用いる)

- 1) クリーンベンチ内でコロニー専用の円形のナイロンメンブレン (Colony/Plaque Screen, PerkinElmer Life Sciences) をコロニーの上からかぶせる。
- 2) メンブレンの全体がプレートの水分によって湿ったら (メンブレンが浮いているときはごく軽くピンセットでなでるとよい)、手早くプレートの裏にメンブレンの穴もしくは切れ込みの位置 (3ヶ所) をマジック等でマークする。
- 3) メンブレンをプレートから静かにはがす。メンブレンのコロニークローンを上にして、blotting paper 上で数分間風乾させる。プレートは37°Cで5時間培養後、4°Cで保存する。

- 4) サランラップを敷いた上に変性溶液 (1 mL/枚) を滴下し、コロニークロンを上にしてメンブレンを置く。ラップを動かして溶液を均一にメンブレンに行き渡らせ、5 分間静置する。
- 5) メンブレンをピンセットでつまみ、中和溶液 (1 M Tris-HCl (pH 7.5)) に浸した blotting paper 上に移して 5 分間静置する。
- 6) メンブレンを 2×SSC で、1~2 分間 ×2 回洗浄する。
- 7) 新しい blotting paper 上で 15 分間風乾させる。
- 8) 乾燥したメンブレンを blotting paper ではさみ、アルミホイルで軽く包んで 80°C、120 分間 baking により固定する (この状態で安定、保存可)。
- 9) baking したメンブレンを 50 mM NaOH-0.1%SDS 溶液中で穏やかに振とうしながら 15 分間洗浄する。
- 10) 2×SSC で 2、3 分間洗浄する (中和処理)。メンブレンに菌が残存していたら 2×SSC を浸透させたキムタオルをメンブレンの上へのせ、軽くたたく (非特異的なバックグラウンドを低下させるため)。
- 11) blotting paper 上で風乾させる。
- 12) Southern hybridization 検出を行う。

【接合伝達】

・ 操作

- 1) 作製したプラスミドを保持する *E. coli* S17-1 を 1.5 mL の LB 試験管培地 (必要に応じて抗生物質を添加) に植菌し、37°C、120 strokes/mim で一晩培養する。
- 2) 一方宿主となる菌株 (*Pseudomonas* 属細菌あるいは *R. eutropha*) は 1.5 mL の NB 試験管培地に植菌し、120 strokes/min、最適生育温度で一晩培養する。
- 3) 一晩培養後、*E. coli* S17-1 と宿主のそれぞれの培養液から、100 μ L ずつマイクロチューブに採取して混合し、宿主の最適生育温度で、120 strokes/min で 6 から 8 時間培養する。
- 4) その後、混合溶液を 10 倍および 100 倍希釈し、原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液の 3 つをシモンズ・クエン酸寒天平板培地 (必要に応じて抗生物質を添加) (Table A-5 参照) にプレーティングし、宿主の最適生育温度で 2 から 3 日間培養する。
- 5) プレーティング後、2 から 3 日でコロニーが形成される。そして形成されたコロニーから大小様々な大きさのものをいくつか選択し、新しいシモンズ・クエン酸寒天平板培地

にストリークし、一晚培養する。

【SDS-PAGE】

・ 試薬

- 1) 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) (分離ゲル buffer の保存溶液)

Tris (トリス) 181.7 g を超純水で溶解して 1 L にする。濃塩酸を用いて pH を 8.8 に調整する。

- 2) 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) (濃縮ゲル buffer の保存溶液)

Tris (トリス) 60.6 g を超純水で溶解して 1 L にする。濃塩酸を用いて pH を 6.8 にする。

- 3) 10 × Running (Tris-glycine) buffer

		最終濃度
Tris-base	30.3 g	0.25 M
Glycine	144 g	1.92 M
10% SDS	10 mL	1%

計 1 L

- 4) 1 × Running (Tris-glycine) buffer : 10 × Running (Tris-glycine) buffer を 10 倍希釈して用いる。

- 5) 10% APS (過硫酸アンモニウム)

- 6) TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine) (Bio-Rad)

- 7) 30% アクリルアミド/ビス保存溶液 (30% T, 2.67% C) ; 30 g のアクリルアミド/ビス混合試薬 37.5 : 1 (Bio-Rad) 超純水に溶解し、全量 100 mL にする。

- 8) 2 × Sample buffer

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2 mL
10% SDS	4 mL
2-Mercaptoethanol	1.2 mL
Glycerol	2 mL
滅菌水	0.8 mL
1% Bromophenol blue	0.4 mL
計 10 mL	

9) 分離ゲル組成

ゲル濃度 (%T)	14
超純水	1.44 mL
30% アクリルアミド / ビス	3.0 mL
ゲル buffer (1.5 M Tris-HCl (pH 8.8))	1.5 mL
10% SDS	60 μ L
10% APS	25 μ L
TEMED	4 μ L
計	6 mL

10) 濃縮ゲル組成

ゲル濃度 (%T)	4
超純水	1.22 mL
30% アクリルアミド / ビス	0.26 mL
ゲル buffer (0.5 M Tris-HCl (pH 6.8))	0.5 mL
10% SDS	20 μ L
10% APS	25 μ L
TEMED	4 μ L
計	2 mL

※ 以上、ゲル厚 0.75 mm の組成

- 11) 分子量マーカー; LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare)、Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad)
- 12) 染色液 (Bio-SafeCoomassie (Bio-Rad))
- 13) 水飽和イソブタノール (2-メチル-1-プロパノール)

・ 操作

<ポリアクリルアミドゲルの作製>

- 1) APS と TEMED 以外の試薬を全て混合し、減圧下で少なくとも 15 min 脱気し、脱気したモノマー溶液に APS と TEMED を添加してよく混合し、分離ゲルモノマー溶液を調製する。
- 2) ピペットを用いてガラスプレートにつけた印 (ガラスプレートの上部から 2 cm の位置) のところまで素早く注入する。泡立った場合はろ紙を用いて取り除く。
※ ゲルの高さは、モノマーが重合する際のゲルの縮みや水の発生に伴い、注入したモノマーの高さよりも低くなるため、注入する際にはガラスプレートの印よりも数 mm 上まで注入する。

- 3) 注入したモノマー溶液の上に、直ちに水飽和イソブタノールを重層し、分離ゲルを固化 (45 min~1 h) させる。
- 4) 重層した水飽和イソブタノールを捨て、超純水でよく洗浄する。ゲル表面が脱水されるため、水飽和イソブタノールを重層したまま 1 h 以上放置しないようにする。
- 5) APS と TEMED 以外の試薬を全て混合し、減圧下で少なくとも 15 min 脱気し、脱気したモノマー溶液に APS と TEMED を添加してよく混合し、濃縮ゲルモノマー溶液を調製する。
- 6) 濃縮ゲルを重層する前に、分離ゲルの表面の水分を、ろ紙などを用いて取り除く。
- 7) ピペットなどを用いてショートガラスプレートの上端まで素早く注入し、コームを差し込んで濃縮ゲルを固化 (30 min ~1 h) させる。

<電気泳動>

- 1) LMW Marker (GE Healthcare) は 2 μ L、サンプルは 10~12 μ L (タンパク質量約 15~50 μ g) をゲルにアプライする。
- 2) 150 V で約 90 min 電気泳動を行う (指示薬である BPB が下端に流れるまで泳動する)。
- 3) 電気泳動後、ガラスを外してゲルを取り出し、ゲルを蒸留水で 5 min 振とうし、これを 3 回繰り返す。
- 4) 蒸留水を捨て、ゲル 1 枚につき Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad) 50 mL で 1 h~一晩振とうする。
- 5) Bio-Safe Coomassie を捨て、蒸留水で少なくとも 30 min 洗浄し、その後、バックグラウンドがなくなるまで数回、水を換えて洗浄する。
- 6) 少量の超純水とともにハイブリバックにいれてスキナーにて画像をパソコンに取り込む。

【ガスクロマトグラフィー (GC) による PHA の分析】

<坂口フラスコ培養>

・ 操作

- 1) 1.5 mL の NB 培地 (必要に応じて抗生物質を添加) に目的の組換え株を植菌し、組換え株の最適温度で、120 strokes/min で 12 h~18 h 振とう培養する。
- 2) 培養後、初発菌体濃度が $A_{600}=0.05$ となるように NB 培養液を 2% グルコースを含む 100

mL の MS 培地（必要に応じて抗生物質を添加）を含む 500 mL 容の坂口フラスコに植菌し、48 h または 72 h 振とう培養（130 strokes/min）を行う。

- 3) 培養液を遠心管に移し、坂口フラスコは蒸留水で共洗いする。
- 4) 冷却遠心機で、4°C、7,000 rpm、10 分間遠心分離する。
- 5) 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。
- 6) 4°C、7,000 rpm、10 分間遠心分離する。
- 7) 上清を捨てる。
- 8) 5)~7)をもう一度繰り返す。
- 9) 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。
- 10) あらかじめ重量を量っておいたマルエム容器に移す。
- 11) -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）。

<PHA の分析>

PHA の定量は、得られた乾燥菌体に含まれる PHA をメタノリシスによって、3-ヒドロキシアルカン酸メチルエステルに変換し、ガスクロマトグラフィー(GC)を用いて行った。

・ 操作

- 1) SDS-PAGE 使用後のポリエステル顆粒懸濁液の残り（SDS-PAGE 使用後の残量約 50 ~100 μ L）あるいは、乾燥菌体約 30 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 Inert Cap1 (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-9 and A-10)。

Table A-9 (温度・時間設定)

ディテクター温度	(DET. TEMP)	250°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)	5 min

Table A-10 (ガス流量)

Air	50 mL/min
H ₂	50 mL/min
He	60 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を用い、一回の注入量は1 μ L 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-11）。

Table A-11

3-hydroxyalkanoate	保持時間 (min)	補正係数
3-hydroxybutyrate (C4)	3.57	1.00
3-hydroxyhexanoate (C6)	5.74	0.51
3-hydroxyoctanoate (C8)	8.97	0.28
3-hydroxydecanoate (C10)	12.29	0.28
3-hydroxy-5- <i>cis</i> -dodecanoate (C12')	15.05	0.28
3-hydroxydodecanoate (C12)	15.28	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 6.84 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。

【Kination 反応 (DNA の 5'末端のリン酸化や標識、PCR 産物のリン酸化) (T4 Polynucleotide Kinase (TOYOBO))】

・ 試薬

1) Denaturing buffer

2)	10 × Blunt End Kinase Buffer	10 μ L
	ATP	1 mM
	T4 Polynucleotide kinase	1 μ L
	滅菌水	up to 100 μ L

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

・ 操作 (平滑末端および 3' 突出 2 本鎖 DNA のリン酸化)

- 1) 基質 DNA 5~20 pmol に Denaturing buffer を加えて 75 μ L にする。
- 2) 90°C、2 min 加熱する。
- 3) 氷上で急冷する。
- 4) 試薬 2) 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 μ 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)。

【*Pseudomonas* sp. 61-3 の total RNA の抽出】

・ 試薬

- 1) RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN) (RNA の分解を防ぐ)
- 2) RNeasy Mini (QIAGEN)
- 3) RNase-Free DNase Set (QIAGEN)
- 4) β -メルカプトエタノール (β -ME)
- 5) リゾチーム

- 6) DEPC (diethyl pyrocarbonate) 処理水
- 7) 100%エタノール
- 8) リゾチーム含有 TE buffer (in DEPC 処理水)

試薬を量り取る薬さじ等は、あらかじめ乾熱滅菌しておく。Tris 0.06 g と EDTA 0.01 g を滅菌遠沈管に量り取り、DEPC 処理水で溶解後、全量を 50 mL にする。あらかじめ pH メーターの棒を、RNase 分解酵素を含む RNase Free (Mercury) で拭き、その後 HCl および NaOH の原液を用いて、pH 8.0 に調整する。調整後に、リゾチームを 50 mg 添加し、よく混合させる。

- 9) β -ME 含有 Buffer RLT (10 μ L/mL)

キットに含まれている Buffer RLT 10 mL に、 β -ME 原液 (濃度は 14.3 M) を 100 μ L 添加して混合した。

・操作

<Total RNA の抽出>

- 1) *Pseudomonas* sp. 61-3 を 1.5 mL の NB 試験管培地に植菌し、28°C で 18 h 振とう培養 (120 strokes/min) を行う。
- 2) 初発菌体濃度が $OD_{600}=0.05$ となるように NB 前培養液を本培養培地である 100 mL の LB 培地および MS 培地 (2% グルコース) を含む 500 mL の坂口フラスコに植菌し、8、12、24 h 振とう培養を行う。
- 3) 本培養後、氷中で酵素活性を停止する。
- 4) 培養液サンプルを 10~100 倍希釈し、 OD_{600} を測定する。
- 5) 検量線から、培養液中の生菌数を算出し、培養液サンプル中の生菌数を求め、採集するサンプル量を決定する。QIAGEN のプロトコールによると、RNeasy Mini スピニングカラムの許容生菌数は、 7.5×10^8 である。
- 6) 4) で求めた生菌を採取するのに必要なサンプル量の 2 倍液量の RNeasy Protect Bacteria Reagent を、あらかじめ反応チューブ (15 mL 容量の遠沈管など) に入れておく。
- 7) 5) であらかじめ RNeasy Protect Bacteria Reagent を添加しておいた遠沈管に、4) で求めた生菌数を含む培養液を入れる。すぐにボルテックスで 5 秒間ミックスする。5 分間室温でインキュベートする。
- 8) $5,000 \times g$ 、10 min 遠心する。

9) 上清を廃棄する。ペーパータオルの上で遠心チューブを 10 sec 逆さまにして、できる限り上清を取り除く。ペレットにした状態で、-20°C で 2 週間、-70°C で 4 週間まで保存可能。

10) リゾチーム含有 TE buffer を必要量添加する。

バクテリア数	TE (リゾチーム含有) buffer	Buffer RLT	エタノール
$< 5 \times 10^8$	100 μ L	350 μ L	250 μ L
$5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$	200 μ L	700 μ L	500 μ L

11) ボルテックスで 10 sec 混合し、室温で 5 min インキュベートする。その間、ボルテックスで 2 min 毎に少なくとも 10 sec インキュベーションする。

12) サンプルに β -ME 含有の Buffer RLT を必要量添加し、激しく攪拌する。このとき、微粒子（おそらく DNA およびその他菌体破砕物だと考えられる）が見える場合には、遠心操作（2 mL 以下では、マイクロ遠心機での最高速度で 2 min、2 mL 以上では 3,000 ~ 5,000 \times g で 5 min）によりペレット化し、上清のみを次のステップに使用する。

13) エタノールを必要量（上記参照）、ライセートに添加する。ピペッティングあるいはボルテックスにより混合する。

14) 13)で形成したエタノールを含むライセートを沈殿物も含めて全て、2 mL コレクションチューブにセットした RNeasy ミニカラムにアプライする。10,000 rpm で 15 sec 遠心し、フロースルーを廃棄する（カラムにアプライする最大容量は、700 μ L）。RNA の抽出と同時に DNaseI 処理を行う場合は、この操作の後に、DNaseI 処理を行う。

15) 700 μ L の Buffer RW1 を RNeasy カラムにアプライする。チューブを閉めて、10,000 rpm で 15 sec 遠心し、フロースルーとコレクションチューブを廃棄する。

16) RNeasy ミニカラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移す。500 μ L の Buffer RPE をカラムにアプライする。ふたを閉めて 10,000 rpm で 15 sec 遠心し、フロースルーとコレクションチューブを廃棄する。

17) 500 μ L の Buffer RPE をカラムにアプライする。ふたを閉めて 10,000 rpm で 2 min 遠心し、フロースルーとコレクションチューブを廃棄する。

18) RNeasy カラムを新しい 1.5 mL 容量のコレクションチューブに移す。30~50 μ L の RNase Free water をメンブレンの中心に直接ピペットでアプライする。ふたを閉めて、10,000 rpm で 1 min 遠心操作を行い、溶出させる。このとき、カラムを遠心前に 10 分間インキュベートすることで、RNA の収量が増加する。

- 19) 予想される RNA 収量が多い場合は、ここで RNase Free water をさらに添加し、18)を繰り返す。もしくは、18)で得られた溶出液をもう一度メンブレンにアプライし、溶出を行う。

<DNase I 処理>

DNase は、一度冷凍保存から溶解させたものは、再冷凍させてはならない。冷凍保存にて、9 ヶ月安定、2~8°C にて 6 週間保存可能。また、物理的衝撃に弱いため、ボルテックスはしない。

- ※ 遠心操作は、必ず室温で行い、20°C 以下にならないよう注意する。RNase-Free DNase Set は、約 50 回分のキットである。1500 Kunitz units の粉末状態の DNase I を、RNase free water に溶かし、2.7 Kunitz units/ μ L になるように調製した (DNase I ストック溶液)。基本的に-20°C で冷凍保存しておき、使用するもののみを冷蔵保存とする。

・操作

<RNA 抽出時に平行して DNase 処理を行う場合>

- 1) 上記 RNA 抽出プロトコールの 14)の後、RNeasy カラムに、RNA を含むサンプルをロードする。
- 2) RNeasy カラムに、350 μ L の Buffer RW1 をアプライする。10,000 rpm で 15 sec 遠心し、フロースルーを捨てる。
- 3) あらかじめ、マイクロチューブで、10 μ L の DNase I ストック溶液を Buffer RDD 70 μ L に添加しておく (1 サンプル分の必要容量)。チューブを上下にして静かにミックスする。
- 4) 3)で作製した DNase I インキュベーション溶液 80 μ L をカラムのメンブレンに直接アプライし、室温で 2 時間半放置する。
- 5) 350 μ L の Buffer RW1 をカラムにアプライして、カラムを室温にて 5 min インキュベート後、10,000 rpm で 15 sec 遠心し、フロースルーおよびコレクションチューブを廃棄する。
- 6) RNA 抽出操作の 16)以降の操作を行う。

<RNA 抽出後に DNase 処理を行う場合>

1) 以下のサンプル量に調製する。

RNA solution	≤87.5 μL
Buffer RDD	10 μL
DNase I	2.5 μL
RNase Free Water	
Up to 100 or 200 μL	

- 2) 20-25°C で、10 min インキュベートする。
- 3) 2)のサンプルに、350 μL の Buffer RLT を添加し、混合する。
- 4) 250 μL のエタノールを加え、ピペッティングする。
- 5) 全量 700 μL のサンプルを 2 mL コレクションチューブにセットした RNeasy ミニカラムにアプライする。チューブを静かに閉めて、10,000 rpm で 15 sec 遠心し、フロースルーを廃棄する。
- 6) カラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移し、カラムに 500 μL の Buffer RPE をアプライする。チューブを静かに閉めて、10,000 rpm で 15 sec 遠心し、カラムを洗浄する。フロースルーは廃棄する。
- 7) 500 μL の Buffer RPE をカラムに添加する。チューブを静かに閉めて、10,000 rpm で 2 min 遠心し、フロースルーとコレクションチューブを廃棄する。
- 8) カラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移し、15,000 rpm で 1 min 遠心し、メンブレンを完全に乾燥させる。フロースルーとコレクションチューブを廃棄する。
- 9) RNeasy カラムを新しい 1.5 mL 容量のコレクションチューブに移す。30~50 μL の RNase Free Water をメンブレンの中心に直接ピペットでアプライする。ふたを静かに閉めて、10,000 rpm で 1 min 遠心操作を行い、RNA を溶出させる。
- 10) 予想される RNA 収量が多い場合は、ここで RNase Free Water をさらに添加し、9)を繰り返す。もしくは、9)で得られた溶出液をもう一度メンブレンにアプライし、9)を行う。

【T4 DNA Polymerase 処理 (DNA の平滑化)】

[T4 DNA Polymerase (TOYOBO)]

・試薬

- 1) T4 DNA Polymerase (TOYOBO)
- 2) 10 × buffer

3) 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 μL に溶解した後、10 \times buffer 2.5 μL 、2 mM dNTPs 0.5 μL を加え、最後に T4 DNA Polymerase を 0.5 μL を加える。
- 2) 37°C、2 h 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) 滅菌水を添加し、全量を 200 μL 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。

【ポリエステルの抽出】

- 1) 培養により得られた乾燥菌体を乳鉢で細かくすりつぶす (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つぶす)。
- 2) 1 L のクロロホルムにすりつぶした約 1.2 g の乾燥菌体を少量ずつ添加し、アルミでフタをし室温で 48 h 以上かくはんさせて PHA を抽出させる (ドラフト内で行う)。
- 3) 抽出液を 0.5 μm 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。
- 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、滴下終了後も一晚スターラーでかくはんする。
- 6) 沈殿が生じたメタノール溶液を再び 0.5 μm の PTFE 膜を用いて吸引ろ過し、フィルターの上に残った PHA 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。

【PHA 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。あらかじめ、ビーカーにクロロホルムを入れておき、スターラーで攪拌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) 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。
- 5) 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 週間以上結晶化させて目的のフィルムを得る。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切丁寧なご指導、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、松崎弘美教授に感謝申し上げます。学部からの6年間に、学会発表等の貴重な経験および学びの場を多く与えてくださり、先生からも多くのことを学ぶことができ、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、組換え株の独立培養にご協力いただくとともに、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、田中賢二教授、ガスクロマトグラフィーの実験操作をはじめ、丁寧なご指導、ご助言を頂きました本学環境共生学部食健康科学科食品分析学研究室、白土英樹教授に心より感謝いたします。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食環境安全性学講座、有菌幸司教授、ポリエステルのさまざまな物性試験にご協力いただきました、東京工業大学大学院総合理工学研究科環境適応型物質講座、柘植丈治准教授および宮原佑宜氏に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、熱心に研究をすすめてくれるとともに、数多くの有益なご意見をいただきました、本学大学院博士前期課程修了の湯之上祐子さん、磯田美子さん、佐志綾乃さん、清水日佳里さん、岩崎美佳さん、本学大学院博士前期課程在籍の後藤早希さん、脇田和さん、本学卒業の藤野加奈子さん、永井紗和子さん、稲田愛さん、近藤夕夏さん、松崎夕美さん、坂本日名子さん、村田和歌子さん、西村綾乃さんに感謝申し上げます。また、研究室で快適に実験できるようにいつも環境を整えてくれた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、9年間お世話になった、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。そして、陰ながら応援し、支えてくれた卒業生の皆様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26年度笹川科学研究助成（研究番号26-604）を受けて実施されました。