

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：57103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340128

研究課題名(和文) Halomonas属の新規PHA合成酵素の活性構造に関する研究

研究課題名(英文) Characterization of the catalytic center of a novel PHA synthase from Halomonas spp.

研究代表者

水野 康平 (MIZUNO, Kouhei)

北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・准教授

研究者番号：80342583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：PHAは石油化学ベースのプラスチックに替わる素材として注目されている。その優れた生体適合性、生分解性が理由である。我々は、海洋から分離した細菌のHalomonas sp. 0-1がグリセロールをPHAに変換することに着眼した。まず、これまで報告されてきたPHA合成酵素の活性中心[GxCxG]のアミノ酸配列と異なる部分があった[SxCxG]。これを遺伝子組換え体で初めて解析した。次に、オペロン構造に着眼してPhasinタンパク質遺伝子を調べたところ、この遺伝子が細胞内PHA蓄積量に影響することを突き止めた。今後、海洋性細菌によるPHA合成の研究、海洋性資源の有効活用に期待できる。

研究成果の概要(英文)：PHAs have attracted attention as a potential alternative to petroleum-based plastics due to their biodegradability, biocompatibility. We focused on Halomonas sp. 0-1, a halophilic bacterium isolated that could synthesize P(3HB-co-3HV) from glycerol. The PHA synthase gene from Halomonas sp. 0-1 was cloned and studied focusing on a potential active center called "lipase box"-like sequence [SxCxG] which is different from the previously known typical sequence [GxCxG]. Then, we focused on the operon structure of Halomonas spp., which seems unique with two phasin coding genes on the upstream region. This operon was transformed into Escherichia coli. The result suggests that these phasin genes could enhance PHA accumulation. We clarified the molecular aspects of the PHA production by a marine bacterium, Halomonas sp. 0-1, which could provide a new insight into the future prospect of PHA production by other marine microorganisms and application of marine resources.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生分解性プラスチック PHA ハロモナス 持続型社会 海洋性資源 生体適合性材料

## 1. 研究開始当初の背景

2013 年、環境省は目指すべき持続可能な社会の姿として、低炭素・循環・自然共生の統合的達成を挙げた<sup>1)</sup>。生分解性プラスチックは炭素循環社会を形成する素材である一方、高性能化、寿命のコントロール、低コスト化などが実用化のための課題となっている<sup>2)</sup>。微生物により合成される生分解性プラスチック Polyhydroxyalkanoate(PHA)は細胞内の炭素貯蔵物質として知られており、その生体適合性により医療用担体としての応用が期待されている。

## 2. 研究の目的

私たちはこれまで環境中から様々な PHA 合成細菌の分離を行ってきた<sup>3~7)</sup>。2009 年には海水から中度好塩性 PHA 合成細菌 *Halomonas* sp. O-1 を分離した。*Halomonas* sp. O-1 は吉草酸添加により優れた物性を有する 3-hydroxyvalerate (3HV) を 20 % 以上含む P[3-hydroxybutyrate(3HB)-co-3HV] 共重合体を生産すること、バイオディーゼル生産により生成する廃グリセロールから PHA 生産することが可能という有用性を持っていた。私たちは、この有用な PHA 合成細菌の PHA 合成酵素遺伝子の解析を以下の2点を主な目的として研究を行った。

### (1) 新規活性中心酸配列の活性構造相関

*Halomonas* 属の PhaC のアミノ酸配列は、既知配列との相関性が 50% 以下である上、PhaC の予測活性中心配列は[S Y C V G]となっており、既知配列[G X C X G]と異なる配列となっていた。この活性への影響を調べる。

### (2) PHA 合成関連遺伝子 PhaP12 の解析

*Halomonas* sp. O-1 の PHA 合成酵素遺伝子群 *phaP* に着目した。PhaP は phasin 蛋白として知られ、細胞内 PHA 顆粒の表面に吸着して顆粒の数や大きさを調節しているとされるが、詳細は分かっていない<sup>9)</sup>。そこで本研究では、独自に分離した *Halomonas* sp. O-1 から *phaP1*、*phaP2* のクローニングおよびその PHA 合成に関する役割を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規活性中心酸配列の活性構造相関

GeneArt® Site-Directed Mutagenesis System(Invitrogen 社製)により、*phaC* 予測活性中心配列への部位特異的変異の導入を行い、変異型 C329A および S327G の取得を試みた(Fig. 1)。変異導入プラスミドを、ヒートショック法により DH5α™-T1R コンピテントセルに形質転換し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社製)を用いてプラスミドを抽出した。pET-3a Vector および O-1 株の *phaC* 配列より *phaC* 全長配列確認用プライマーを設計し、(株)ファスマックにて片鎖シーケンスを行った。変異導入型プラスミドを *E. coli* BL21(DE3)株に形質転換し、SDS-PAGE により発現を確認した。

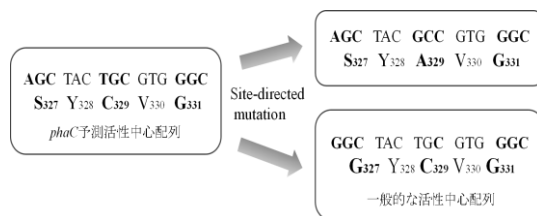


図 1. 変異導入の概略図

*Halomonas* sp. O-1 の予測活性中心配列のシステインをアラニンに変異させる。また、特異的な配列であるセリンを、一般的なグリシンに変異させる。

### (2) PHA 合成関連遺伝子 PhaP12 の解析

大腸菌体内で PHA を生産させるために PHA 合成細菌として知られる *Ralstonia eutropha* H16 由来のモノマー供給酵素 *phbA*(β-ケトチオラーゼ)、*phbB*(アセチル-CoA 還元酵素)を含む pGEM<sup>®</sup>ABex プラスミド 10)を QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社製)により抽出を行った。取得した *Halomonas* sp. O-1 の *phaP1P2C* 全長配列を PCR 増幅し、pGEM<sup>®</sup>ABex プラスミドと共に 37°C、1 時間制限酵素処理を行った。制限酵素として Xba I、BamH I、Bgl II を用いた。制限酵素処理後に *Halomonas* sp. O-1 の *phaP1P2C* を pGEM<sup>®</sup>ABex に導入し、大腸菌 *Escherichia coli* JM109 に形質転換を行った。*phaP1P2C* 組み換え大腸菌および同様に作製した *phaC* 組み換え大腸菌を用いて増殖曲線の作成を行

った。作製した両組み換え大腸菌を 37°C、121 rpm で振盪培養を行った。2~8 時間おきに濁度測定を行い、48 時間までの菌体増殖曲線を作成した。また、同様に 2~8 時間おきに培養液を 2 mL 取得して PHA 合成を測定した。PHA はクロトン酸に変換して、高速液体クロマトグラフィーにより測定することで培養液 2 mL 中の PHA 合成量を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規活性中心酸配列の活性構造相関

*Halomonas* sp. O-1 の活性中心の通称リパーゼボックス様配列[S Y C V G]に対して、中心のシステイン C をアラニン A に置換したところ、酵素が完全に失活したことから、本配列が活性中心であることを確認した。次に、典型的配列に対して異なるセリン S を典型配列のグリシン G に置換した組換え酵素は、通常よりも 5 倍程度、平均分子量の長いポリマーを合成することが分かった。このことにより、*Halomonas* 属が、特異的な配列を有する活性中心によってより高分子量の PHA を生産している可能性が示唆された。高分子量ポリマーは、物性にも変化をもたらすことが知られており、PHB も超高分子量になることで柔軟で有用性の高い物性に変化することが期待できることから、生理的研究にも産業的にも興味深い知見が得られた。

##### (2) PHA 合成関連遺伝子 *PhaP12* の解析

*Halomonas* sp. O-1 のから *phaP1*(261 bp)、*phaP2*(411 bp) の取得に成功した。*phaP* を推定アミノ酸配列に変換し、PHA 合成 *Halomonas* 属 7 種の *phaP1*、*phaP2* との相同性を確認したところ全ての *Halomonas* 属の *phaP1*、*phaP2* と高い相同性を示した。

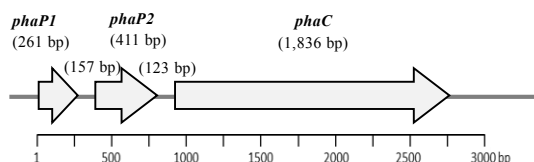


図 2. 取得した *Halomonas* sp. O-1 のオペロン概略図 *phaP1P2C* は他の *Halomonas* 属にも保存されていた。

次に、*Halomonas* sp. O-1 の *phaP1P2C* 全長配列の PCR 増幅産物および抽出した pGEM<sup>®</sup>ABex プラスミドを電気泳動により確認した結果、抽出および *phaP1P2C* 全長配列の PCR 増幅に成功した。次に pGEM<sup>®</sup>ABex プラスミドおよび *phaP1P2C* の制限酵素処理を行った。電気泳動により pGEM<sup>®</sup>ABex では全長配列の 6.1 kbp 付近に、*phaP1P2C* では全長配列 2.9 kbp 付近にバンドが確認できた。制限酵素処理後に *phaP1P2C* を pGEM<sup>®</sup>ABex プラスミドに導入した。形質転換を行った大腸菌から抽出したプラスミドを鋳型として *Halomonas* sp. O-1 の *phaP1P2C* 内部配列の PCR 増幅が確認できたことから組み換え大腸菌の取得に成功した。

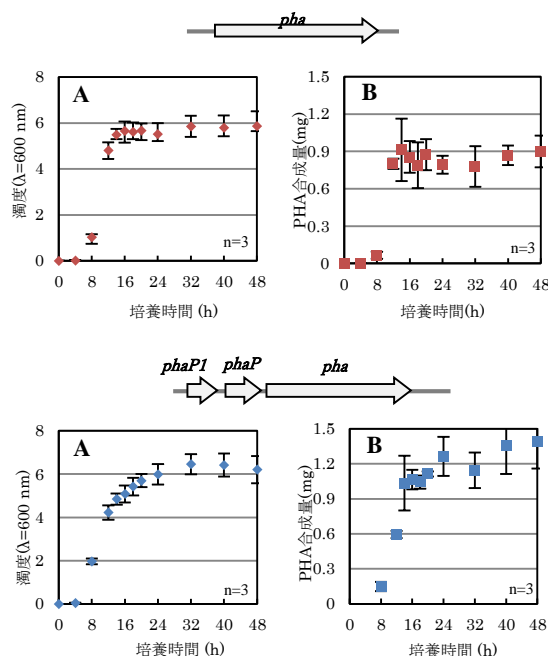


図 3. 組み換え大腸菌の増殖曲線および PHA 測定結果

A は増殖曲線、B は培養液 2 mL 中の PHA 合成量、上の 2 つのグラフは *phaC* 組み換え大腸菌、下の 2 つのグラフは *phaP1P2C* 組み換え大腸菌の結果を示している。

図 3 の A に *phaC* 組み換え大腸菌、*phaP1P2C* 組み換え大腸菌の増殖曲線を作成した。その結果、両菌体共に似た増殖曲線を作成したことから *phaC* 組み換え大腸菌と *phaP1P2C* 組み換え大腸菌の培養液内にはほぼ同数の菌体が存在すると考えられる。次に図 3 の B に

*phaC* 組み換え大腸菌、*phaP1P2C* 組み換え大腸菌の培養液 2 ml 中の PHA 合成量を測定した結果を示した。その結果、*phaC* 組み換え体では 16 時間以降の PHA 合成量にほとんど変化がなく 48 時間まで増加しないことが確認できた。また、*phaP1P2C* 組み換え大腸菌では 16 時間以降も PHA 合成量が増加し続け、48 時間で最大 1.38 mg の PHA 合成量を示した。両菌体の結果から *phaC* 組み換え体、*phaP1P2C* 組み換え体共に培養液中に同数の菌体が存在するが PHA 合成量は *phaP1P2C* 組み換え大腸菌でのみ 24 時間以降も PHA を合成していた。よって *Halomonas* sp. O-1 の *phaP1P2* には PHA 合成量を増加させる機能を持っていると推測できる。今後、PHA 合成を効率化させる手段として、また、効率化の新しい知見を得る観点から期待できる発見であったと考えられる。

<引用文献>

- ① 平成 26 年度環境省重点施策、環境省、(2013).
- ② 土肥義治、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(2001).
- ③ Mizuno K, Ohta A, Hyakutake M, Ichinomiya Y, Tsuge T. *Polym. Degrad. Stabil.* 95:1335-1339(2010).
- ④ Tomizawa S, Hyakutake M, Saito Y, Agus J, Mizuno K, Abe H and Tsuge T. *Biomacromolecules* 12:2660-2666(2011).
- ⑤ Hyakutake M, Tomizawa S, Mizuno K, Abe H, Tsuge T. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:1421-1429 (2014).
- ⑥ Kihara T, Ilham M, Tsuge T, Mizuno K. *The 4rd International Conference on Bio-based Polymers* (Sep. 25-28, Seoul, Korea), POSI-09(2013).
- ⑦ Hyakutake M, Tomizawa S, Mizuno K, Tamao H, Abe H, Tsuge T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: DOI 10.1007/s00253-014-6276-4 (2014).
- ⑧ Ilham M, Nakanomori S, Kihara T, Hokamura A, Matsusaki H, Tsuge T, Mizuno K. *Polym. Degrad. Stabil.* 109:416-423(2014).
- ⑨ 田口精一、蛋白質・核酸・酵素、50(3):262-269(2005).

主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件、全て査読あり)

- ① Taguchi S, Ooi T, Mizuno K, Matsusaki H. Advanced and needs for endotoxin-free production strains *Appl Microbiol Biotechnol* 99:9349-9360 (2015). DOI 10.1007/s00253-015-6947-9
- ② Hiroe A, Shiraiishi M, Mizuno K, Tsuge T. Behavior of different polyhydroxyalkanoate synthases in response to the ethanol level in *Escherichia coli* cultures *Polymer Journal* 47:767-770 (2015). DOI:10.1038/pj.2015.53
- ③ Tsuge T, Hyakutake M, Mizuno K. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:6231-6240 (2015). DOI 10.1007/s00253-015-6777-9
- ④ Hyakutake M, Tomizawa S, Sugahara I, Murata E, Mizuno K, Abe H, Tsuge T. Carboxy-terminal modification of polyhydroxyalkanoate (PHA) via alcoholysis reaction catalyzed by Class IV PHA synthase. *Polym Degrad Stab* 117:90-96 (2015). doi: 10.1007/s00253-015-6777-9.
- ⑤ 木原崇博・柘植丈治・水野康平 グリセリン資化菌 *Halomonas* sp. O-1 の PHA 合成遺伝子群の解析 北九州高専研究報告 48:75-78 (2015).
- ⑥ Hyakutake M, Tomizawa S, Mizuno K, Hisano T, Abe H, Tsuge T. A common active site of polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus cereus* YB-4 is involved in polymerization and alcoholysis reactions. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:4701-4711 (2015).
- ⑦ Ilham M, Nakanomori S, Kihara T, Hokamura A, Matsusaki H, Tsuge T, Mizuno K. Characterization of Polyhydroxyalkanoate Synthases from *Halomonas* sp. O-1 and *Halomonas elongata* DSM 2581: Site-Directed Mutagenesis and Recombinant Expression. *Polym Degrad Stab* 109:416-423 (2014). doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.04.024
- ⑧ Hyakutake M, Tomizawa S, Mizuno K, Abe H, and Tsuge T. Alcoholic cleavage of polyhydroxyalkanoate chains by class IV synthases induced by endogenous and exogenous ethanol. *Appl Environ Microbiol* 80:1421-1429 (2014). doi:

## 〔学会発表〕(計 11 件)

- ① Kouhei Mizuno, Takahiro Kihara, Takeharu Tsuge. Cloning and Heterologous Expression of a Novel Subgroup of Class IV PHA (Polyhydroxyalkanoate) Synthase Genes in the Genus *Bacillus*. The 5th international conference on bio-based polymer. 6月24~27日(2015) シンガポール(シンガポール) 国立シンガポール大学
- ② PHA 重合酵素が示すアルコールシス能に關与するアミノ酸残基の特定 百武真奈美、水野康平、久野玉雄、阿部英喜、柘植丈治 第67回日本生物工学会 10月26-28日(2015) 鹿児島県鹿児島市城山ホテル
- ③ 田中 優、水野康平 *Bacillus* 属 PHA 合成耐熱性細菌の分離と解析 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 26~29 日 岡山大学
- ④ Mulyana Ilham, Satoko Nakanomori, Takahiro Kihara, Ayaka Hokamura, Hiromi, Matsusaki, Takeharu Tsuge, Kouhei Mizuno. Characterization of Polyhydroxyalkanoate Synthases from *Halomonas* sp. O-1 and *Halomonas elongate* DSM2581. 第63回高分子学会年次大会 2014 年 05 月 27~29 日 北海道札幌コンベンションセンター
- ⑤ 木原崇博、柘植丈治、水野康平 好塩性細菌 *Halomonas* sp. O-1 の PHA 合成酵素遺伝子群の機能解析 環境微生物系学会合同大会 2014 年 10 月 21~24 日 静岡県アクロシティ浜松コンgresセンター
- ⑥ 廣江綾香、白石雅也、水野康平、柘植丈治 エタノールによるポリヒドロキシアルカン酸の分子量低下と重合酵素種による影響差異の検証 第66回日本生物工学会大会 2014 年 9 月 9~11 日 北海道大学
- ⑦ 田中 優・水野康平 *Bacillus* 属 PHA 合成耐熱性細菌の分離 環境微生物系学会合同大会 2014 年 10 月 21~24 日 静岡県アクロシティ浜松コンgresセンター
- ⑧ 伊藤駿、柘植丈治、水野康平 耐アルカリ性を有する PHA 合成新規細菌の探索 環境微生物系学会合同大会 2014 年 10 月 21~24 日 静岡県アクロシティ浜松コンgresセンター
- ⑨ Takahiro KIHARA, Mulyana ILHAM, Takeharu TSUGE, Kouhei MIZUNO Characterization of Polyhydroxyalkanoate Synthases from *Halomonas* sp. O-1 and *Halomonas*

*elongate* DSM2581, The 4rd International Conference on Bio-based Polymers, POS1-09 2013 年 9 月 25~28 日 Korea, Seoul

- ⑩ 木原 崇博・福本 圭・水野 康平, 海洋性細菌 *Halomonas* 属の PHA シンターゼ候補遺伝子の機能解析 第50回化学関連支部合同九州大会 講演要旨集 p.58, 2013 年 7 月 6 日 北九州市
- ⑪ 水野 康平、木原 崇博 海洋性細菌 *Halomonas* 属の PHA シンターゼ候補遺伝子の機能解析 環境バイオテクノロジー学会 講演要旨集 p.67, 2013 年 5 月 30 日~6 月 1 日 北九州市

## 〔図書〕(計 0 件)

## 〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

## 〔その他〕

ホームページ等

北九州高専 水野研究室ホームページ

<http://w3-chem.kct.ac.jp/~mizuno/mizuno/top.html>

## 6. 研究組織

## (1) 研究代表者

水野 康平 (MIZUNO, Kouhei)

北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・准教授

研究者番号：80342583

## (2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号：

## (3) 連携研究者

柘植 丈治 (TSUGE, Takeharu)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・准教授

研究者番号：70332260