

# グリセリン資化菌 *Halomonas* sp. O-1 の PHA 合成遺伝子群の解析

木原 崇博・柘植 丈治\*・水野 康平

Characterization of PHA synthesis related genes of a glycerol-utilizing bacterium *Halomonas* sp. O-1  
Takahiro KIHARA, Takeharu TSUGE\*, Kouhei MIZUNO

## Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biopolyesters synthesized by a wide variety of microorganisms. We focus on *Halomonas* sp. O-1, a moderately halophilic eubacterium isolated from seawater that could synthesize P(3HB-co-3HV). In addition, this strain produces PHA from glycerol, which can be obtained from by-products of biodiesel manufacturing industry. This study was designed to characterize the operon of PHA synthesis genes of *Halomonas* sp. O-1 in which two *phaP* genes encoding phasin were located upstream of a PHA synthase gene (*phaC*). This operon (*phaPIP2C*) was ligated with pGEM<sup>®</sup>ABex harboring *phbA<sub>Re</sub>* and *phbB<sub>Re</sub>* required for PHA accumulation in *Escherichia coli* JM109. The PHA accumulation by the *E. coli* with the complete operon was the same to that with the operon lacking of *phaPIP2* until 16 h of the cultivation. In the stationary growth phase, however, further accumulation occurred with the complete operon, and the accumulation at 48 h was 1.5 times higher than that with the operon lacking of *phaPIP2* suggesting that these phasin genes could enhance PHA accumulation in stationary growth phase. Produced PHA from glucose-grown recombinant *E. coli* was analyzed by <sup>1</sup>H-NMR.

**Key words:** *Halomonas*, halophilic bacteria, PHA synthase, *phaP*, phasin

## 1. 諸言

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。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、その PHA 合成酵素遺伝子(*phaC*)を明らかにした<sup>8)</sup>。また、*Halomonas* sp. O-1 は吉草酸添加により 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る。今回、私たちは *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した。

## 2. 実験方法

### 1. *Halomonas* sp. O-1 *phaP* の取得

*Halomonas* sp. O-1 の *phaC* の塩基配列と近縁でありゲノム情報が公開されている *Halomonas elongata* DSM 2581 を基に O-1 の *phaP* 取得用プライマーを設計した (Forward Primer: 5'-AAT GGA AAA GCT GTT TAG CGA-3', Reverse Primer: 5'-ACA GTA GCT CAG CAG GTT-3')。設計したプライマーを基に *Halomonas* sp. O-1 の DNA を鋳型として *phaP1*、*phaP2* を PCR 増幅し、塩基配列の決定を行った。

### 2. *phaPIP2C* 組み換え大腸菌の作製

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<sup>10)</sup>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 *phaPIP2C* 全長配列を PCR 増幅し、pGEM<sup>®</sup>ABex プラスミドと共に 37℃、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 *phaPIP2C* を pGEM<sup>®</sup>ABex に導入し、大腸菌 *Escherichia coli* JM109 に形質転換を行った。作製した組

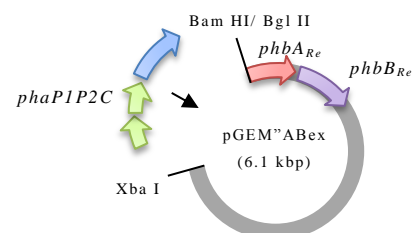


図 1. *Halomonas* sp. O-1 *phaPIP2C* 導入プラスミドの作製

\*東京工業大学大学院 総合理工学研究科物質科学創造専攻

み換え大腸菌からプラスミドを抽出し、*phaPIP2C* 内部配列を PCR 増幅することで導入の確認を行った。

### 3. 組み換え大腸菌の増殖および PHA 合成の測定

*phaPIP2C*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。まず、50 µg/mL Ampicillin添加汎用培地LB培地(yeast extract, 5 ; tryptone, 10 ; NaCl, 10 g/L)10 mLを試験管に分注し、作製した両組み換え大腸菌を接種して37°C、121 rpm、18時間振盪前培養を行った。前培養液100 µLを50 µg/mL +2% グルコース添加LB培地200 mLに植継ぎ、37°C、121 rpmで振盪培養を行った。2~8時間おきに濁度測定( $\lambda=600$  nm)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。測定方法として取得した菌体を1時間真空乾燥を行った。乾燥菌体に濃硫酸を200 µL添加して121 °C、40分間熱濃硫酸処理を行い、PHAをクロトン酸に変換した<sup>11)</sup>。高速液体クロマトグラフィーによりクロトン酸を測定することで培養液2 mL中のPHA合成量を測定した。今回、P(3HB)の検量線から組み換え大腸菌のPHA合成量を算出し、培養時間におけるPHA合成量を求めた。

### 4. <sup>1</sup>H-NMRによる組み換え大腸菌生産 PHA の構造解析

2-3と同様の培養条件で前培養を行い、また同様の培養条件にて48時間本培養を行った。PHAを生産させた組み換え大腸菌をクロロホルム50 mLに添加し、72時間攪拌させ、菌体内からPHAを抽出した。自然濾過により菌体を除去し、ロータリーエバポレーターを用いてクロロホルムを完全に揮発させ、PHAを析出させた。次に、取得したPHAをメタノールおよびクロロホルムにより精製を行った。抽出および精製を行ったPHAを乾燥させた後に標準物質として1 vol%のTMSが添加された重クロロホルムに溶解し、400 MHz <sup>1</sup>H-NMRにより構造解析を行った。

## 3. 実験結果

### 1. *Halomonas* sp. O-1 *phaP* の取得

*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。

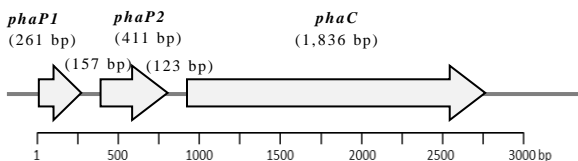


図2. 取得した*Halomonas* sp. O-1の*phaPIP2C*概略図  
*phaPIP2C*配列はPHAを合成する*Halomonas*属に保存されている。

### 2. *phaPIP2C*組み換え大腸菌の作製

*Halomonas* sp. O-1の*phaPIP2C*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*phaPIP2C*全長配列のPCR増幅に成功していた。次にpGEM<sup>+</sup>ABexプラスミドおよび*phaPIP2C*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、*phaPIP2C*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*phaPIP2C*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*phaPIP2C*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。

### 3. 組み換え大腸菌の増殖および PHA 合成の測定

図3のAに*phaC*組み換え大腸菌、*phaPIP2C*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*phaPIP2C*組み換え大腸菌の培養液中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、*phaPIP2C*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、*phaPIP2C*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、*phaPIP2C*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*phaPIP2C*組み換え

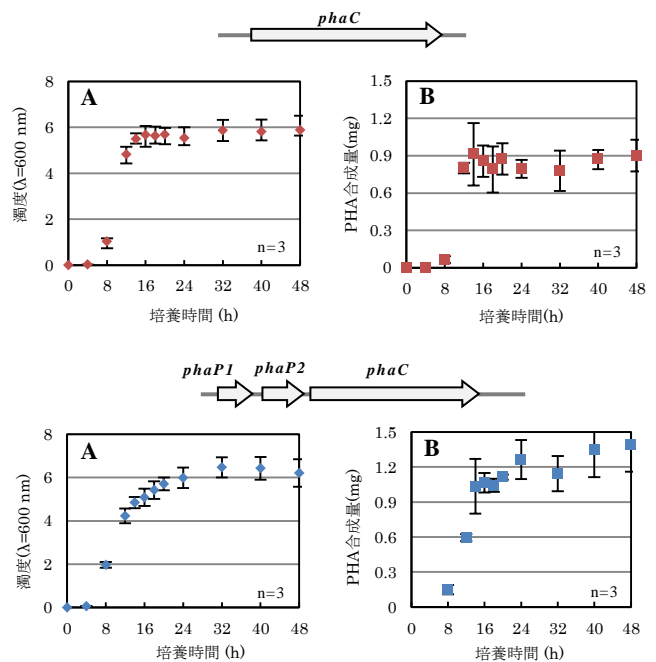


図3. 組み換え大腸菌の増殖曲線およびPHA測定結果

Aは増殖曲線、Bは培養液2 mL中のPHA合成量を示した。また、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*phaPIP2C*組み換え大腸菌の結果を示している。

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 *phaPIP2* 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。

#### 4. <sup>1</sup>H-NMR による組み換え大腸菌生産 PHA の構造解析

*phaPIP2C* 組み換え大腸菌および *phaC* 組み換え大腸菌から抽出した PHA を構造解析した結果を図 4 に示した。<sup>1</sup>H-NMR 構造解析により両菌体共に同じ構造の PHA を合成していることが確認できる。*phaC* 組み換え大腸菌の PHA では 3.0~4.0 付近にピークが得られたが、このピークは PHA のピークではなかったため、抽出または精製の際に残留した不純物ではないかと考えられる。また、両菌体共に合成している PHA に共重合体のピークが確認できなかった。*Halomonas* sp. O-1 の *phaP1*、*phaP2* には PHA の構造を変化させる機能を持っていないと推測できる。

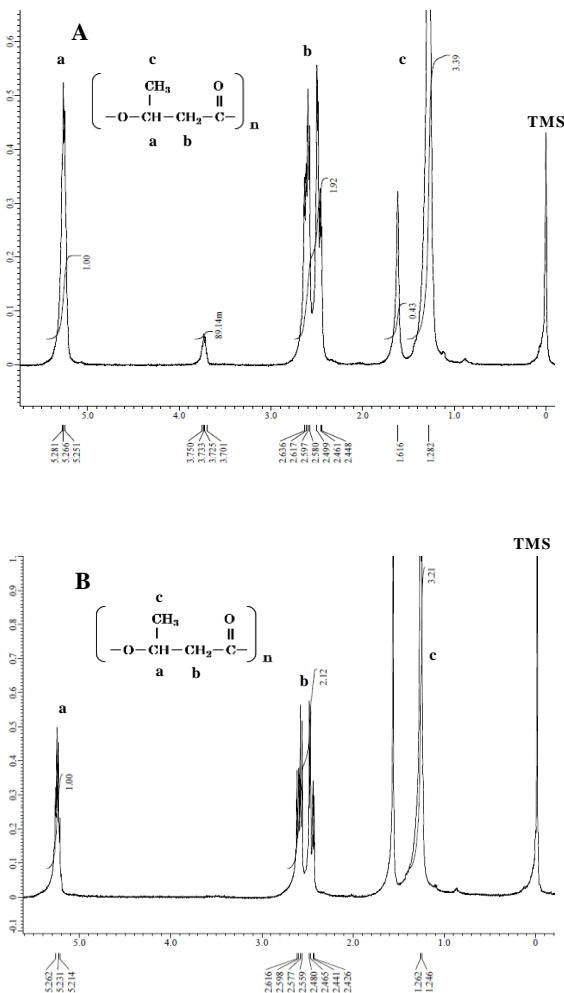


図 4. 組み換え大腸菌生産 PHA の <sup>1</sup>H-NMR 構造解析

A は *phaC* 組み換え大腸菌、B は *phaPIP2C* 組み換え大腸菌の結果を示している。ピークはそれぞれ P(3HB) の a~c の水素に対応している。

#### 4. 結言

今回、我々は *Halomonas* sp. O-1 の PHA 合成酵素遺伝子群 *phaP* を取得し、組み換え大腸菌を作製することに成功した。組み換え大腸菌を用いて *phaP* の機能解析を行った結果、組み換え大腸菌において *phaPIP2* には PHA 合成量を増加させる機能を持つことを確認することができた。また、生産させた PHA を <sup>1</sup>H-NMR 構造解析を行なうことで両組み換え大腸菌ともに純粋な P(3HB) を生産する事が確認できた。今回の結果から *Halomonas* sp. O-1 の *PhaP* には PHA の組成には関与しておらず、PHA 合成量を増加させる機能を確認することができた。また、*PhaP* には PHA 顆粒の数や大きさを調整する機能があると報告されていることから生産された PHA の分子量にも変化を及ぼす可能性が考えられるため、今後組み換え大腸菌の PHA の分子量を測定することで *PhaP* の機能について検討していく。

#### 5. 謝辞

本研究は、科学研究費 基盤研究 (C) 課題番号:25340128 により助成を受けて実施された。

#### 6. 参考文献

- 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).
- 10) Takase K, Taguchi S, Doi Y. *J. Biochem* 133:139-145 (2003).
- 11) Karr DB, Waters JK, Emerich DW. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(6):1339-1344(1983).

(2014 年 11 月 10 日 受理)