

PHA (polyhydroxyalcanoate)合成耐熱性 *Bacillus* 属の分離と解析

田中 優・水野 康平

Isolation and characterization of thermotolerant PHA-producing *Bacillus* species

Masaru TANAKA and Kouhei MIZUNO

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biopolyesters that are accumulated by bacteria and archaea, and applicable for biodegradable and biocompatible plastics for medical devices. Here we report PHA production of a thermotolerant *Bacillus* strain isolated from a soil sample. The *Bacillus* sp. Ha was able to grow up to 50°C and synthesize P[3-hydroxybutyrate (3HB)]. Produced PHA from the glucose-grown cells was analyzed by ¹H-NMR. The PHA synthase gene (*phaC*) cloned from this strain had 1,086 bp in length and showed 95–97% homology with those from some *Bacillus cereus* group strains.

Key words: Biodegradable plastics, Polyhydroxyalkanoate, *Bacillus*, Thermotolerant bacteria

1. 緒言

近年、低炭素循環型社会の実現のために、生分解性プラスチックが注目されている。生分解性プラスチックは、使用時には通常のプラスチックと同様に使うことができ、使用後は微生物によって二酸化炭素と水に分解されることから、環境に優しい未来のプラスチック源として注目されている。ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は生分解性、生体適合性、熱可塑性などの性質があり、微生物によってグルコースやセルロースのような炭素源から合成される生分解性プラスチックの一つである¹⁾。PHA の産業利用では製造コストが高いため医療分野での活躍が期待されている。現在、PHA の工業的生産ではグラム陰性菌が利用されているが、毒性のあるリポポリサッカライド (LPS) が PHA と共に生成されることから医療分野には適していないことが問題である。そこで、LPS 非生産のグラム陽性菌である *Bacillus* 属に注目した。*Bacillus* 属では一般的な PHA である P(3HB) よりも機械的性質に優れている PHA 共重合体を合成する株も報告されている。また *Bacillus* 属は耐熱性や耐アルカリ性の細菌を含むことから高い安定性があり、優れた増殖能を持つので広い分野で産業利用されている²⁻⁷⁾。そこで、本研究では *Bacillus* 属による PHA 生産の実用化を目指すために、耐熱性 *Bacillus* 属に注目し研究を行った。これまでの PHA 合成耐熱性細菌は 55°C まで報告されている⁸⁻¹⁰⁾。よって、耐熱性の目標温度を 55°C とし、55°C 付近で PHA 合成を行う PHA 合成耐熱性 *Bacillus* 属の探索を行った。

2. 実験方法

1. PHA 合成耐熱性菌の分離

大分県の酸性温泉 (pH 3.5, 78°C)、中性 (pH 7.0)、弱アルカリ性 (pH 8.5) の源泉よりサンプルを取得した。また、土壌サンプルは福岡県のカルスト台地より取得した。環境細菌分離用培地 R2A 培地 (yeast extract 0.5, tryptone 0.5, casamino acid 0.5, glucose 0.5, KH₂PO₄ 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.05 g/l) 及び汎用培地 LB 培地 (yeast extract 5, tryptone 10, NaCl 10 g/l) にグラングラムを 10 g/l、

PHA 簡易検出用脂溶性蛍光物質 Nile red 溶液 (Nile red 2.5 mg, 99.5 % -DMSO 10 ml) を 4 vol% 添加し分離用培地とした。取得したサンプルを分離用培地を用いて 50~65°C、pH 4.0~8.5、好気条件下で培養した。生育したコロニーに紫外灯を照射し、蛍光発光するコロニーを Nile red 陽性株として分離した。

2. PHA 合成能の評価法

取得した Nile red 陽性株を 2% グルコース添加 R2A 液体培地及び LB 液体培地 200 ml で 37°C、24 時間振盪培養後、集菌、凍結乾燥した。次に、乾燥菌体約 10 mg を量り取り、濃硫酸 200 μl 加え、121°C、40 分間熱濃硫酸処理を行った。反応終了後、室温まで冷却し、氷冷中で 0.014 N 硫酸水溶液を 800 μl 加えて攪拌し、0.45 μm 径の Millex-LHPTFE フィルターで濾過し HPLC 用測定サンプルとした。HPLC 測定条件は、カラムはイオン型 H の架橋度 8% スチレン-ジビニルベンゼン共重合体陽イオンカラム Fermentation Monitoring Column (150 × 7.8, BIO-RAD 社製) を使い、ガードカラムとして Micro-guard Cation H Cartridge (30 × 4.6 mm) を用いた。移動相には 0.014 N 硫酸水溶液を用い、流速は 0.7 ml/min とした。カラム温度は 60°C とし、210 nm の吸光度を測定した。検量線の作成には精製した P(3HB) を用いた。

また、PHA 合成の限界温度を確認するために、2% グルコース添加 BBL Trypticase Soy Broth (BBL Trypticase Soy Broth 30 g/l) を用いて、37~55°C まで培養温度を様々に変更し、48 時間振盪培養した。培養液を集菌、凍結乾燥を行い、乾燥菌体量及び HPLC を用いて菌体あたりの PHA 合成量を測定した。

3. ¹H-NMR による PHA の構造解析

NMR 用サンプルとして、乾燥菌体約 100 mg にクロロホルム 100 ml を加え 72 時間攪拌した。攪拌後の溶液を No.2 濾紙 (ADVANTEC 社製) で濾過し、ナス型フラスコに移した。濾液をロータリーエバポレーターで完全に揮発させ、PHA を析出させた。析出させた PHA をメタノールとクロロホルムを用いて精製し、サンプルとした。

1 vol% TMS 含有重クロロホルムに PHA を溶解し、400MHz $^1\text{H-NMR}$ (JNN-ECS400, JEOL) を用いて測定を行った。

4. PHA 合成酵素遺伝子 *phaC* のクローニング

PHA 合成酵素サブユニット遺伝子 *phaC* (1,086 bp) をターゲットとした PCR 反応液を作成した (Green Master Mix Promega 社製)。鋳型には寒天に生育させたコロニーを使用した。フォワードプライマーは *phaC_cer_F1* (5'-AAC GGC GGA TTA TAT ATG TAA-3') リバースプライマーには *phaC_cer_R1* (5'-GTA TTC AAA ACA ACT TAC-3') を用いた。この PCR 反応液をサーマルサイクラー (SANYO 社製 DNA AMPLIFIER MIR-D40) で反応させた。PCR 産物を QIAprep PCR purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、塩基配列を決定した。その配列を Web 上の解析プログラム BLAST を用いて近縁種を特定した。

3. 実験結果

1. PHA 合成耐熱性菌の分離結果

PHA 合成耐熱性菌の分離結果を表 1 に示した。温泉、土壌から分離した約 600 株のうち 50~65°C で生育する Nile red 陽性株を 55 株分離することができた。このうち、HPLC を用いた PHA 合成の検出を行った結果、土壌より分離した *Bacillus* sp. Ha と *Bacillus* sp. HH-DD2 の 2 株で 37°C において PHA 合成を確認することができた。*Bacillus* sp. HH-DD2 は 40°C 以上では PHA 合成を行わなかったが、*Bacillus* sp. Ha では PHA 合成が確認できた。そこで、本研究では *Bacillus* sp. Ha に注目し研究を進めた。

表 1. PHA 合成耐熱性菌分離結果

分離源	分離温度 (°C)	生育 pH	Nile red 陽性株数	HPLC 検出株数
温泉 (pH3.5)	55	4.0	27	0
	65	4.0	10	0
源泉 (pH7.0)	65	7.0	3	0
	65	7.0	9	0
源泉 (pH8.5)	55	8.5	4	0
土壌	50	8.0	2	2

2. *Bacillus* sp. Ha の培養温度と PHA 合成量

Bacillus sp. Ha の培養開始 48 時間後の 37~55°C における乾燥菌体量を図 1A に示す。*Bacillus* sp. Ha は 37°C で乾燥菌体量が最大の 3.0 g/l になり、45°C では 1.5 g/l、50°C 以上では 0.2 g/l となった。一方、*Bacillus* sp. Ha の培養開始 48 時間後の 37~55°C における菌体あたりの PHA 合成量を図 1B に示す。乾燥菌体量と同様に 37°C で菌体あたりの PHA 合成量が最大の 25 wt% になり、40°C 以上では 5 wt% になった。40°C 以上における PHA 合成を確認できた。次に *Bacillus* sp. Ha が 37°C 及び 50°C で合成する PHA を $^1\text{H-NMR}$ を用いて解析した結果を図 2 に示した。取得したピークを解析した結果、37、50°C で共に P(3HB) を合成していることが確認できた。以上の結果より、*Bacillus* sp. Ha が PHA 合成耐熱性 *Bacillus* 属であると考察する。

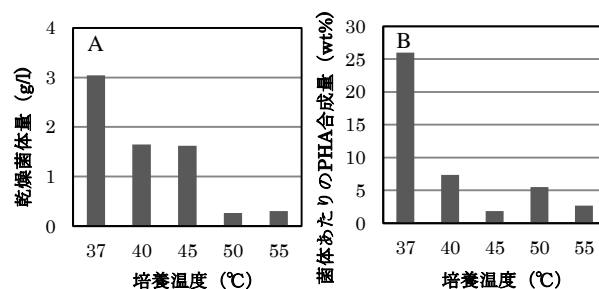


図 1. 37~55°C における乾燥菌体量及び PHA 合成量

A: 培養 48 時間後の培養液中の乾燥菌体量

B: 培養 48 時間後の菌体あたりの PHA 合成量

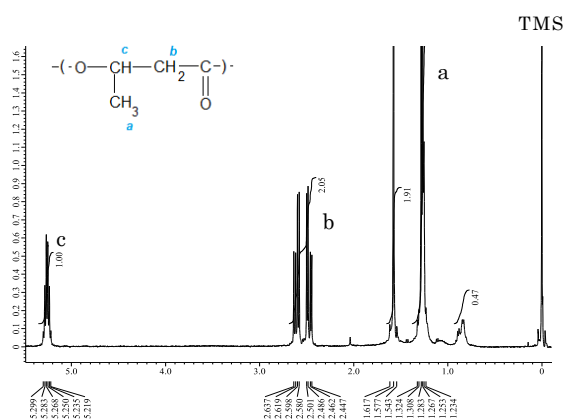


図 2. $^1\text{H-NMR}$ による *Bacillus* sp. Ha 合成 PHA の解析結果

3. *phaC* 配列のクローニング

Bacillus sp. Ha の PHA 合成酵素サブユニット遺伝子 *phaC* 配列と推定アミノ酸配列を図 3 に示した。*Bacillus* sp. Ha *phaC* の中にリパーゼボックス様配列であると示唆される [GYCMG] 配列を確認した。次に、BLAST を用いて近縁種を特定した結果を表 2 に示した。*Bacillus* sp. Ha の *phaC* は *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 由来 *phaC* と相同性が 97% であった。そして、取得した推定アミノ酸配列をもとにリパーゼの安定性に関与する因子であることが報告されているプロリン (P)、グリシン (G)、芳香族アミノ酸 (F, Y, W, H) について解析した¹¹⁾。解析結果を表 3 に示した。*Bacillus* sp. Ha の *phaC* は同じ *Bacillus* 属である *Bacillus cereus* や *Bacillus megaterium* の *phaC* とプロリン、グリシン、芳香族アミノ酸の組成には大きな変化は見られなかった。今後、三次構造予測を用いたジスルフィド結合や塩橋を解析することで *phaC* の安定性を評価する。また、取得した *phaC* を *in vitro* における活性試験を行い、37°C 以上での活性の評価を行う。

表 2. *Bacillus* sp. Ha の *phaC* の BLAST 解析結果

Bacteria of closely related <i>phaC</i>	Accession No.	Homology% (bp)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	gbCP000903.1	97 (1,048/1,082)
<i>Bacillus thuringiensis</i> MC28	gbCP003687.1	95 (1,025/1,079)
<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112	gbCP006863.1	95 (1,022/1,079)

```

CTTCTTTTTTTTAGAAAGAAATCGACCGAA AAGGGGATAAAAA
SD
ATGACTACATTTCGTAACAGAATGGGAAAAGCAATTAGAGTTGTACCCAGAAGAA
M T T F V T E W E K Q L E L Y P E E
TATCGCAAAGCATATCGTCGTGTGAAAAGAGCGAGCGAAAATTTATTACGCGAA
Y R K A Y R R V K R A S E I L L R E
CCGAAACCAAGTTGGTTTAAACCAAAAAGAGGTTATTTGGACGAAGAATAAA
P E P Q V G L T P K E V I W T K A N K
ACGAAGCTGTATCGTTACATTCAAAACAAGAAAAAACGCAGAGAGTTCCAATC
T K L Y R Y I P K Q E K T Q R V P I
TTATTAATATATGCTCTTATTAATAAACCATATATATTGGATTTAACTCCAGGAA
L L I Y A L I N K P Y I M D L T P G
ATAGTTTAGTGAATATTTAGTAGATCGTGGTTTGTATATATGCTTGATTG
N S L V E Y L V D R G F D V Y M L D
GGGCACATTTGGTTTAAAGAGATAGTCATTTGAAATTTGATGATTTCTGTTGAT
W G T F G L E D S H L K F D D F V F
TATATTGCAAAGCAGTGAAGAAAGTAAATGAGAATCGAAAATCGGACGAGAT
D Y I A K A V K K V M R T A K S D E
TTCTTACTTGGTTATTGCATGGGTGGAACATTAACATCTATTTATGCAGCACTT
I S L L G Y C M G G T L T S I Y A A L
CATCCGCACATGCAATTCGTAACCTGATTTTATGACAAGTCCTTTGATTTCT
H P H M P I R N L I F M T S P F D F
CTGAAACAGGATTATACGGTCTTTACTAGATGAGAAATTTCAATTTAGATA
S E T G L Y G P L L D E K Y F N L D
AAGCGGTTGATACATTCGAAATATTCGGCCGAAAATGATTGATTTGGAAATA
K A V D T F G N I P P E M I D F G N
AGATGTTAAACCAATTACAACCTCGTTGGTCCATATGTTGCTTTAGTCGATCG
K M L K P I T N F V G P Y V A L V D
TTCAGAAAATGAGCGCTTCGTGAAAGCTGGAAGTTAGTTCAAAAATGGGTTGG
R S E N E R F V E S W K L V Q K W V
TGACGGTATTCCATCCAGCGGAATCTTATAGACAATGGATTCTGATTTTAT
G D G I P F P G E S Y R Q W I R D F
CAAATAATAAATTAGTGAAGGTTGAACTCGTTATTCGGCGAACAAAGGTAGAC
Y Q N N K L V K G E L V I R G Q K V
CTTGCAAAATTAAGCGGAATGTCTTAAATATTTCCGCGAAACGTGATCATATTG
D L A N I K A N V L N I S A K R D H
CTTTGCCATGTCAGTAGAGGCTTTACTTGTATCATATTTCTAGCACAGATAAACA
I A L P C Q V E A L L D H I S S T D
GTATGTATGTTTACCAACAGGACATATGTCATTTGTTGATGGTGAACGGCTGT
K Q Y V C L P T G H M S I V Y G G T
AAAGCAAACATACCGACGTTGGAAATTTGGCTTGAAGAGCGTTCTAATTA
A V K Q T Y P T V G N W L E E R S N *
    
```

図 3. *Bacillus* sp. Ha PHA 合成酵素サブユニット遺伝子 *phaC* 塩基配列及び推定アミノ酸配列

SD: 推定 SD 配列
 GYCMG: 推定リパーゼボックス様配列

表 3. *Bacillus* 属 *PhaC* のアミノ酸組成 (%)

	<i>Bacillus</i> sp. Ha	<i>B. cereus</i> (gi 288558704)	<i>B. megaterium</i> (gi 294347935)
プロリン	5.8	5.8	5.8
グリシン	6.1	6.4	5.5
芳香族アミノ酸	13.5	13.5	12.7

4. 結言

今回、我々は PHA 合成耐熱性 *Bacillus* 属の探索を行い、PHA 合成酵素サブユニット遺伝子 *phaC* の取得に成功した。酸性、中性、アルカリ性の温泉やカルスト台地のような土壌から耐熱性 Nile red 陽性株を 55 株分離し、そのうち 2 株で HPLC を用いて PHA の合成が確認でき

た。2 株に関して 40°C 以上における PHA 合成量を測定した結果、*Bacillus* sp. Ha が 50°C 付近で PHA を合成することを確認した。また、¹H-NMR による 37°C 及び 50°C での *Bacillus* sp. Ha 合成 PHA の構造解析を行った結果、共に P(3HB) を合成することが確認できた。PHA 合成耐熱性 *Bacillus* 属を取得できたと考察し、*Bacillus* sp. Ha の *phaC* を取得した。取得した *phaC* をアミノ酸に変換し解析した結果、[GYCMG] のリパーゼ様配列が含まれていることを確認できた。*Bacillus* sp. Ha の *phaC* を BLAST を用いて解析した結果、*Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 と同一性が 97 % だった。また、タンパク質の安定性に関するアミノ酸組成を解析した結果、*Bacillus* sp. Ha の *PhaC* は *Bacillus cereus* や *Bacillus megaterium* の *PhaC* とアミノ酸組成に大きな変化は見られなかった。

5. 参考文献

- Gabriel J, McCool and Maura C. *J Bacteriol* 183: 4235–4243(2001).
- Valappil SP, Boccaccini AR, Bucke C, Roy I. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91:1–17(2007).
- Mizuno K, Fukuda K, Fujii A, Shiraishi A, Takahashi K and Taniguchi H. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:531–539(2008).
- Mizuno K, Ohta A, Hyakutake M, Ichinomiya Y and Tsuge T. *Polym Degrad Stabil* 95:1335–1339(2010).
- Hyakutake M, Saito Y, Tomizawa S, Mizuno K and Tsuge T. *Biosci Biotechnol Biochem* 75:1615–1617(2011).
- Tomizawa S, Hyakutake M, Saito Y, Agus J, Mizuno K, Abe H and Tsuge T. *Biomacromolecules* 12:2660–2666(2011).
- Hyakutake M, Tomizawa S, Mizuno K, Abe H and Tsuge T. *Appl Environ Microbiol* 80: 1421–1429(2014).
- Pantazaki AA, Dimopolou MI, Simou OM, and Pritsa AA. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 939–951(2010).
- Satoh Y, Tajima K, Nakamoto S, Xuerong H, Matsushima T, Ohshima T, Kawano S, Erata T, Dairi T, and Munekata M. *J Appl Microbiol* 111: 811–817(2011).
- Hezayen FF, Gutierrez MC, Steinbuchel A, Tindall BJ, and Rehm BH. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 633–637(2010).
- Joel DAT, Supachok S, Lind AF, Paul T, and Malcolm D. W. *J Mol Biol* 323:859–869(2002).

(2014 年 11 月 10 日 受理)