

# 高機能性ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)合成能を有する合成酵素の開発

佐藤 康治 [北海道大学大学院工学研究科／助手]

## 背景・目的

ある種の微生物はその体内にポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を蓄積することが知られている。PHAは自然環境中で分解されることから生分解性プラスチック、様々な生物から発見されたことより生体適合性材料への応用が期待されている。このPHAの物性は構成モノマーユニットにより粘弾性に富むエラストマータイプから硬度を有するプラスチック材料にまで変化させることができる。しかしPHA合成の主役であるPHA合成酵素の基質特異性により重合可能なモノマーに制限がある。そこで、合成酵素の立体構造を解明し遺伝子工学的手法を用いて様々なモノマーを重合できる優良合成酵素を開発することを本研究の最終目的とした。本研究では*Bacillus* sp. INT005由来PHA合成酵素サブユニットであるPhaRの精製条件および結晶化条件について検討した。

## 内容・方法

アフィニティーコロマトグラフィーは特定のタンパク質に対する選択性が高く優れた精製手法である。本方法と他の精製方法とを組み合わせることで、さらに効率的な精製が可能となる場合がある。構造解析などの目的で高度な精製が要求される場合や大量精製では、イオン交換クロマトグラフィーで分離した後アフィニティーコロマトグラフィーを行うと、精製時間が短縮され、かつ、高純度の組換えタンパク質が得ることができる。そこで、陰イオン交換クロマトグラフィーと金属キレートアフィニティーコロマトグラフィーを組み合わせ、PhaRの精製を試みた。精製したPhaRの結晶化条件はHampton Research社製結晶化キット(Crystal Screen、MembFac、Natrix)を用いてシッティングドロップ法により検討した。

## 結果・成果

### 1. PhaRの精製条件の検討

まずは、タンパク質高発現ベクターpTrc99Aに $phaR$ 遺伝子を導入したプラスミドを構築し、PhaRを可溶化状態で発現させる培養条件について検討した。培養温度やIPTG濃度について検討したところ、30℃で3時間培養した後に最終濃度が0.25mMになるようにIPTGを添加、その後さらに5時間培養した場合にPhaRを可溶化状態で発現させることができることがわかった。

この条件で大量培養を行い、PhaRの精製条件について

検討した。陰イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの3ステップで高純度のPhaRを得ることができた。しかしタンパク質濃度が低かったため限外濃縮を行ったところ、メンブランにPhaRが吸着してしまいタンパク濃度が低下した。このため、新たな精製方法を検討した。

### 2. His-tag融合PhaRの精製条件の検討

ヒスチジン6残基(His-tag)をNまたはC末端に融合させた組換えタンパク質は金属キレートアフィニティーコロマトグラフィーで簡単に精製できている。そこでC末端His-tag融合タンパク質発現ベクターpQE-16にPCRで增幅した $phaR$ 遺伝子を挿入し、His-tag融合PhaR発現プラスミドを構築した。このプラスミドを大腸菌に導入し、可溶化状態でPhaRを発現させることができか検討した。その結果、先に示した培養方法と同様の方法で高発現させることができた。

この条件で大量培養を行い、陰イオン交換クロマトグラフィー、金属キレートアフィニティーコロマトグラフィー(Ni-NTA agarose)の2ステップで精製したところ、高濃度かつ高純度のHis-tag融合PhaRを得ることができた。

### 3. 結晶化条件の検討

精製したHis-tag融合PhaRを用いて結晶化条件を検討した。その結果、多くの条件で小さな結晶が確認されたが、これは透析の際に用いた緩衝液中のリン酸が結晶化したものと考えられた。1.0 M tri-sodium citrate dihydrateを含む0.1 M HEPES-sodium(pH 7.5)の条件ではタンパク質の結晶と思われる結晶が確認できたことから、pHを7.0、7.5、8.0、tri-sodium citrate dihydrate濃度を1.0、1.5Mとして結晶化するか検討したが、PhaRの結晶は確認できなかった。

## 今後の展望

透析の際にリン酸緩衝液を用いたため、大部分の結晶化条件でリン酸の結晶ができてしまった。今後はリン酸緩衝液以外でPhaRを安定に保存可能な緩衝液について検討する。そして結晶化条件の再検討およびX線結晶構造解析を行う。また、*Bacillus* sp. INT005以外のPHA合成酵素についても精製条件および結晶化条件を検討し立体構造を明らかにする。得られた立体構造をもとに遺伝子工学的手法により様々なモノマーを重合可能なPHA合成酵素を開発する。