

第5章 ポリウレタン分解酵素遺伝子のクローニング

第1節 緒言

第3章において、*Comamonas acidovorans* TB-35株由来のポリウレタン（PUR）分解酵素（PURエステラーゼ）の性質について述べた。本酵素には活性部位やPUR付着部位等いくつかの機能ドメインが存在することが示唆されており、PURエステラーゼによるPUR分解機構についてさらに解析を進めるためには、分子生物学的な解析が不可欠である。そこで、TB-35株由来のPURエステラーゼのクローニングを行い、その全塩基配列を決定することとした。

第2節 実験材料及び実験方法

2-1 供試菌株及び試薬

DNA供与体として *C. acidovorans* TB-35株を用いた。クローニングを行う際の宿主として *Escherichia coli* DH10B株[F' *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80d *lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ -*tpsL nupG*]を、サブクローニングを行う際の宿主として *E. coli* JM109株[F' *traD36 lacIq* Δ (*lacZ*) M15 *proAB/recA1 endA1 gyrA96* (*Nal^r*) *thi hsdR17* (*rk-*, *mk+*) *supE44 e14-* (*mcrA-*) *relA1* Δ (*lac-pro AB*)]を用いた。クローニングベクターとして pUC19及び pUC118を用いた。*

アンピシリンは明治製菓株式会社製、IPTG (isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside)及び X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)はNova Biochem社製のものを用いた。シーケンス反応にはApplied Biosystems社製のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kitを用いた。DNA断片のディレーションには、BAL31 nuclease（宝酒造株式会社

製)を用いた。制限酵素等のDNA関連試薬は宝酒造株式会社もしくは東洋紡績株式会社製のものを用いた。その他の試薬については第2章に準じた。

2-2 培地及び培養条件

*E. coli*の培養にはLuria-Bertani (LB)培地を用いた。必要に応じて、100 μ g/mlの濃度でアンピシリンを添加した。形質転換した*E. coli*の培養には23.8 μ g/mlのIPTG、20 μ g/mlのX-galを添加した。平板培養にはこれらの培地に1.5%の濃度で寒天を加えた平板培地を使用した。JM109株のコンピテントセル作製にはSOB培地を、JM109株及びDH10B株の形質転換時にはSOC培地を用いた。アンピシリン、IPTG及びX-galは、オートクレーブ滅菌後の培地を約50℃まで冷却した後に無菌的に添加した。LB培地、SOB培地及びSOC培地の組成を表5-1に示した。

形質転換体からのプラスミド少量調製の際には、100 μ g/mlの濃度のアンピシリンを含む2 mlのLB培地を入れた小試験管に、菌体を1白金耳植菌し、37℃で8時間往復振盪機(150 oscillations/min)で培養した。平板培養は、37℃の恒温器内で一晩行った。

2-3 コンピテントセルの作製

E. coli DH10BはGIBCO BRL社製のMax Efficiency DH10B Competent Cellsを用いた。その他のコンピテントセルの作製は、Hanahan法(34)に従った。

2-4 TB-35株の全DNAの調製

TB-35株の全DNAの調製は、SaitoとMiuraの方法(35)を改変し、図5-1に示した方法で行った。第3章に述べた方法で培養したTB-35株の菌体(湿重量約0.3 g)を6 mlのTESSバッファー(30 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 25% Sucrose)に懸濁した。ここに5 mg/ml-TESSのリゾチームを2 ml添加した後、37℃で30分間加温した。ここに10 mg/mlのproteinase Kを1 ml添加し、37℃で30分間加温した。ここに10% SDSを1 ml添加し、激しく攪拌した。これをフィルターで濾過し不純物を取り除いた後、等量のフェノールを加え、攪拌後遠心して上清を回収した。同様の操作を、フェノール-クロロホルム-イ

表5-1 LB培地、SOB培地及びSOC培地の組成

LB培地

Ingredient	g / l
trypton (Difco)	10
yeast extract (Difco)	5
NaCl	10
pH 7.5	

SOB培地

Ingredient	g / l
trypton (Difco)	20
yeast extract (Difco)	5
NaCl	0.585
KCl	0.186
*MgCl ₂	10 mM
*MgSO ₄	10 mM
pH 7.0	

* マグネシウム塩はフィルター除菌し、オートクレーブした培地を50℃に冷ましてから無菌的に加えた。

SOC培地

Ingredient	
SOB medium	1 l
*Glucose sol. (2M)	10 ml
1.01 l	

* glucose sol. はフィルター除菌したものを用了。

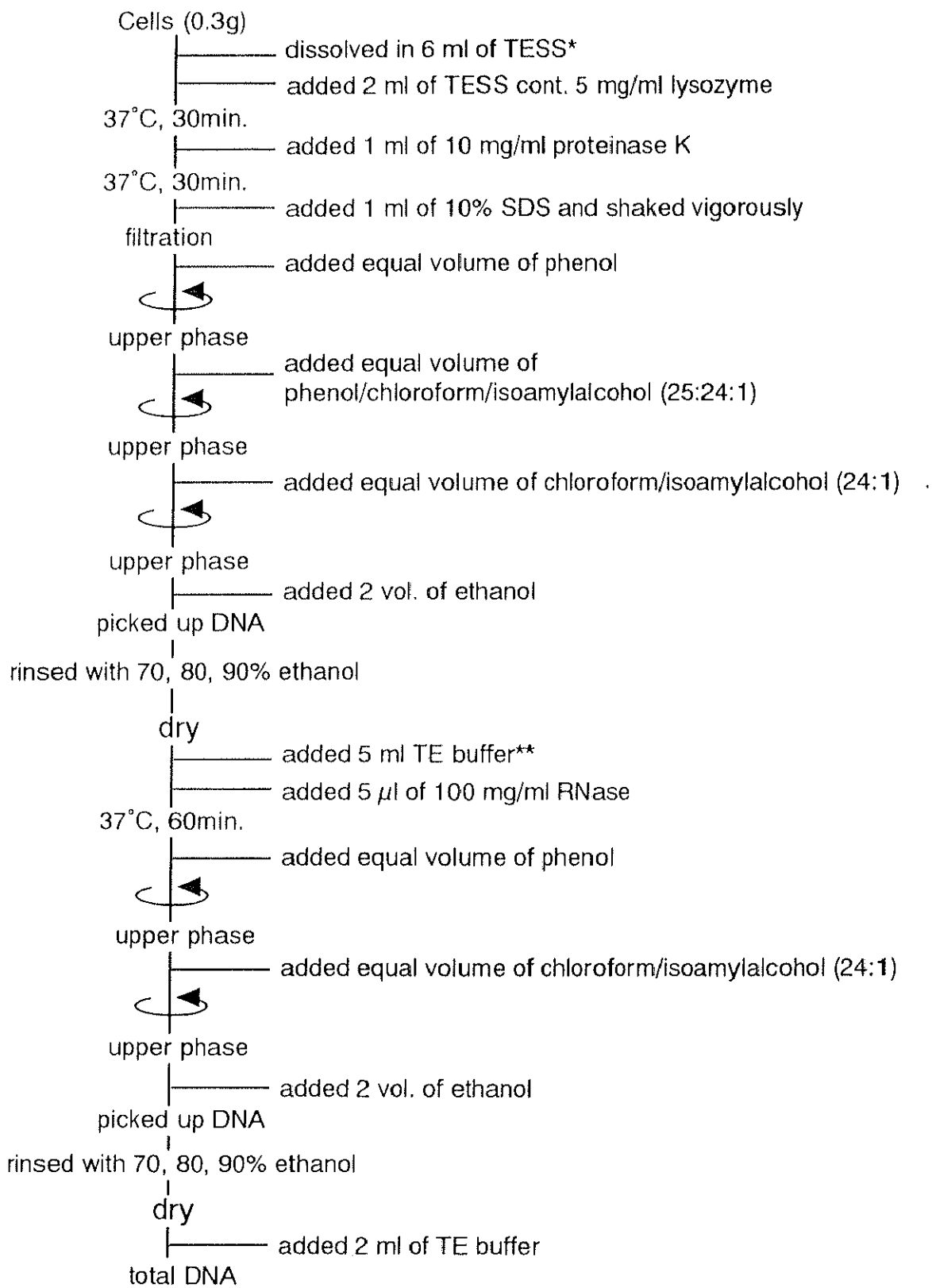


図5-1 全DNAの調製法

*TESS : 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 25% sucrose

**TE buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA

ソアミルアルコール (25:24:1) 及びクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) を用いて行った。フェノールは、あらかじめTEバッファー (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA) にて平衡化したものを用いた。回収した上清に2倍量のエタノールを加え、ガラス棒にDNAを巻き取った。70、80、90%エタノールで洗浄、乾燥後、5 mlのTEバッファーに溶解させた。ここに100 mg/mlのRNaseを5 µl加え、37°Cで60分間加温した。その後、フェノール及びクロロホルム抽出を各1回行った。抽出後の上清に2倍量のエタノールを加え、ガラス棒にDNAを巻き取った。70、80、90%エタノールで洗浄、乾燥後、2 mlのTEバッファーに溶解させた。これを全DNAとした。

2-5 プラスミドDNAの調製

プラスミドの調製法は、アルカリ法(36)に準じて行った。

2-6 DNAプローブの作製

第3章で決定したPURエステラーゼのN末端アミノ酸配列 (Xxx-Gly-Gly-Ser-Asp-Asn-Asp-Ser-Ser-Ser-Asn-Asn-Gln-Gly-Ala-Pro) の一部 (-Asn-Asp-Ser-Ser-Ser-Asn-Asn-Gln-Gly-) をもとに、5'-AAC-GAC/T-AGC-TCG-AGC-AAC-AAC-CAG-GGC-3'という27 merのオリゴヌクレオチドを宝酒造株式会社に依頼して作成した。コドンは、*Comamonas* 属細菌のコドン使用頻度を参考にして選択した。オリゴヌクレオチドの標識は、キット (ECL 3'-oligolabelling and detection systems, Amersham Pharmacia Biotech社製) のマニュアルに従って行った。2本鎖DNAプローブについては、キット (Gene Images, Amersham Pharmacia Biotech社製) のマニュアルに従って作製した。作成したプローブは、使用時まで-20°Cで保存した。

2-7 サザンハイブリダイゼーション

ブロッティングには、日本エイドー社製の高速転写装置 (NB-1513-C型) を用いた。ブロッティング膜には、Amersham Pharmacia Biotech社製のナイロンメンブレン (Hybond N+) を用いた。変性、中和、固定条件は、転写装置に付属のマニュアルに従った。ハイ

ブリダイゼーション及び検出は上述のキットのマニュアルに従って行った。ハイブリダイゼーション温度は、オリゴヌクレオチドをプローブとしたときは37°C、2本鎖DNAをプローブとしたときは60°Cで行った。

2-8 塩基配列の決定

塩基配列決定には、Applied Biosystem社製のオートシーケンサー model 373A、及びサイクルシーケンスのためのPCR反応には、Applied Biosystem社製のGeneAmp PCR System 9600を用いた。シーケンスゲルの作製には、東洋紡績株式会社製の調製済アクリルアミド溶液、Pagesetを用いた。操作は付属のマニュアルに従った。

得られた塩基配列のデータは、SDCソフトウェア開発会社製のコンピュータプログラム、GENETYX-MAC ver. 8を用いて解析した。

2-9 活性測定

2-9-1 エステラーゼ活性

2 mlのLB培地を含む小試験管に、得られた形質転換体を平板培地より1白金耳植菌し、37°Cで8時間培養した。培養液1 mlを1.5 ml容マイクロチューブに入れ、8000 rpmで3分間冷却遠心した。上清を除去し、得られた菌体に0.4 mlの20mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え、よく懸濁後、超音波破碎機 (Microson社製) にて菌体を破碎した。この菌体破碎液のエステラーゼ活性を第2章で述べた方法で測定した。なお、エステラーゼ活性は、培養液1 mlあたりに換算した。

2-9-2 プレートアッセイ

酵素が発現した形質転換体を容易に検出するための方法として、PURのポリエステル部位を構成するポリジエチレングリコールアジペートを乳化させた平板培地を作製した。

ジクロロメタンに溶解したポリジエチレングリコールアジペート (終濃度0.5%) 及びPlysurf A (終濃度200ppm、第一工業化学社製) を含む蒸留水を、超音波を照射しながら攪拌し、ポリジエチレングリコールアジペートを液中に乳化分散させた。その後、80°Cで

3時間加温しジクロロメタンを除去した。そこに1.2%となるように寒天を、0.3%となるようにAgar mate (Diversified Biotech社製)を加え、121°Cで15分間オートクレーブ滅菌した。Agar mateは、培地の透明度を高めるために添加した。溶液が約50°Cまで冷えた後、100 μ g/mlの濃度でアンピシリンを添加し、同様にアンピシリンを添加したLB平板培地上に重層した。

発現した酵素によってポリジエチレングリコールアジペートが分解されると、コロニーの周辺にクリアゾーンが形成される。そのクリアゾーンを指標として、酵素が発現した形質転換体を選択した。

2-10 ポリウレタン分解酵素遺伝子のクローニング

TB-35株の全DNA500 ngを制限酵素*Eco*RIで完全分解し、分解産物に対してN末端アミノ酸配列より作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブがハイブリダイズした約10 kbp付近のDNA断片をアガロースゲルより回収し、*Eco*RIで切断後脱リン酸化処理したpUC19に挿入した。DNA断片の回収には日本エイドー社製のNB-7000ペンタタッチリカバリーを用いた。脱リン酸化処理には東洋紡績株式会社製のBacterial Alkaline Phosphatase (BAP)を用い、反応は37°Cで1時間行った。ライゲーションには同株式会社製のLigation Highを用い、反応は16°Cで1時間行った。DNA断片が挿入されたpUC19を用いて、*E. coli* DH10Bを形質転換させた。アンピシリン、IPTG及びX-galを含むLB平板培地上に生育した形質転換体50コロニーについてプラスミドを抽出し、*Eco*RIで切断後、同プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。そのうち最も強いシグナルを示したプラスミドを有する*E. coli* DH10Bをポリジエチレングリコールアジペートを乳化させたプレート上で培養し、コロニーの周辺に生じたクリアゾーンを観察した。

第3節 実験結果

3-1 ポリウレタン分解酵素遺伝子のクローニング

TB-35株の全DNA100 ngを、アガロースゲル電気泳動に供したところ、染色体DNAの他に1つのプラスミドが含まれていた。この全DNAに対して、PURエステラーゼのN末端アミノ酸配列をもとに作製したオリゴヌクレオチド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結果、本プローブは染色体DNAに相補した(図5-2)。

クローニングの結果得られた50の形質転換体のうち、16個のプラスミドがプローブとハイブリダイズした。そのうち最も強くハイブリダイズした約10 kbpのDNA断片を有するプラスミドを、pUR33とした。pUR33を有する*E. coli* DH10Bをポリジエチレングリコールアジペートを乳化させたプレート上で培養したところ、コロニーの周辺にクリアゾーンが観察された。エステラーゼ活性を有する最小領域を決定するため、各種制限酵素を用いて約10 kbpのDNA断片の限定分解を行い、約2.5 kbpの*Pst* I-*Sph* I断片を得た。このDNA断片の制限酵素地図を図5-3に示した。この断片が挿入されたpUC19を用いて、*E. coli* JM109を形質転換したところ、得られた形質転換体はポリジエチレングリコールアジペートプレート上でクリアゾーンを形成した。

3-2 全塩基配列決定

サブクローニングの結果得られた2.5 kbp *Pst* I-*Sph* I断片のうち、2,174 bpの塩基配列を決定した。決定した塩基配列及び推定アミノ酸配列を図5-4に示した。その結果、この断片はATGを開始コドン、TGAを停止コドンとする1,644 bpからなるオープンリーディングフレーム(ORF)を含んでいた。翻訳開始点(Met)の7bp上流には、リボソーム結合部位と推定される配列(AGGAGA)が存在した。転写開始点については、mRNAの解析が必要とされるが、*E. coli*の-10及び-35領域に相当すると思われる配列(TTGAA及びGTGCAA)が認められた。また、終始コドンの22 bp下流に、転写終結シグナルの一種である ρ -independent terminatorに特徴的なステムループ構造(GGCCCGC---GCGGGCC)とAT含量の高い領域が存在した。ORF全体のGC含量は63.4%であった。

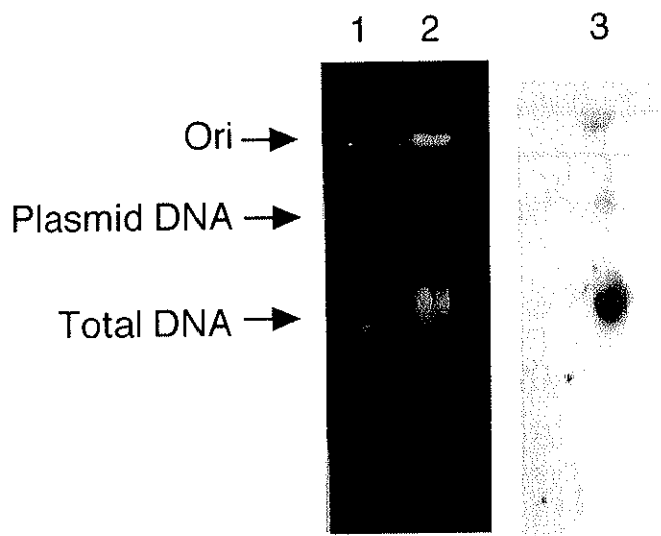


図5-2 TB-35株の全DNAに対するサザンハイブリダイゼーション

レーン1：分子量マーカー (λ *Hind*III)

レーン2：TB-35株の全DNAのアガロースゲル電気泳動パターン

レーン3：精製酵素のN末端アミノ酸配列をもとに作製したオリゴヌクレオチドをプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行った結果

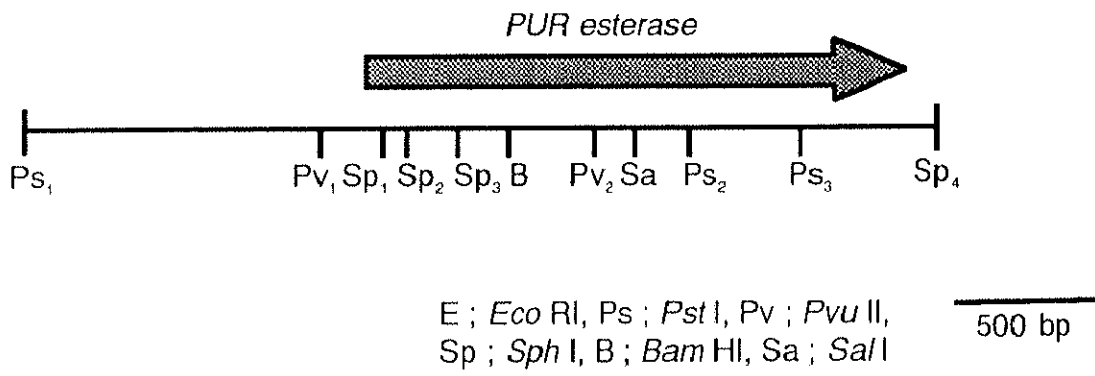


図5-3 2.5 kbp断片の制限酵素地図


```

1456 CGCTACTGGACCAACTTTGCCCGCACCAGCAATCCGAATAATGGCGACCCGGTGGCGACGTCATGGCCTGCATTACG 1533
    R Y W T N F A R T S N P N N G D P V A T S W P A F T

1534 GGACCGACCAAGGTGCTCGGACTGGACGTCGCCTCCGCTGGCGGCATCAGGGAAC TGGCCACGTCGAGACCGACCAC 1611
    G P T K V L G L D V A S A G G I R E L A T F E T D H

1612 AAGTGCAACACGGCCTGGACATCACTGACTTTTTGATCAAGCCCTGGCGCAGCATGGCCCGCTTCGGCGGGCCTTTTT 1689
    K C N T A W T S L T F
                                     ───▶ ───◀

1690 TATTGCACCGCATGACGTTTGGGACGCAAGTCATTCCTCGGGATACTCGCGCAGTCGGCCCTGGACCATTCCAGTT 1767
1768 CCTGACACACCAGATGAGACCGTTGGTTTTCTCTGGCAAGGGCATCGCGGAAATTCGGGCAGCATGC 1835

```

図5-4 PUR分解酵素遺伝子の全塩基配列 (2)

推定アミノ酸配列を塩基配列の下に示した。塩基配列より推定された、Shine-Dalgano (S. D.)配列、-35, -10領域、 ρ -independent terminatorを配列中に示した。PUR分解酵素のN末端アミノ酸配列を1本線で、プロテアーゼ限定分解によって決定されたアミノ酸配列を2本線で示した。pUR22及びpUR25の5'末端を▽で示した。

翻訳開始点 (Met) より26残基下流に、TB-35株由来酵素のN末端アミノ酸配列に相当する塩基配列が存在したことから、本酵素は26残基のアミノ酸からなるシグナルペプチドを有し、ArgのC末端がプロセッシングサイトであることが示された。また、本酵素は疎水性アミノ酸を55.4%含み、疎水性の高いタンパク質であることが示された。シグナル配列が除去されたタンパク質は、522残基のアミノ酸からなりその推定分子量は55,110 Daであった。また、197-201番目にSerを活性中心とする加水分解酵素に特徴的な配列 (-Gly-X₁-Ser-X₂-Gly-, X₁; Glu, X₂; Ala) が認められた。以後、このORFを *pudA* と称する。

3-3 ポリウレタン分解酵素遺伝子の発現

制限酵素地図の解析の結果、PURエステラーゼ遺伝子は2.5 kbp *Pst* I-*Sph* I断片の3'末端側に位置することが明らかとなった。そこで、2.5 kbp *Pst* I-*Sph* I断片の5'末端をさらにデイレーションした。その結果、翻訳開始点より164 bp上流までを含む断片、及び翻訳開始点より129 bpを欠損した断片が得られた。これらの断片をpUC118の *lac* プロモーター下流に挿入したベクターを、それぞれpUR22及びpUR25とした。図5-4にpUR22及びpUR25の開始点を示した。pUR22及びpUR25を有するJM109株をIPTGを含むポリジエチレングリコールアジペート平板培地上で生育させたところ、PUR22の周辺にクリアゾーンが形成された (図5-5-A)。N末端側の43残基を欠損したpUR25及び *pudA* を持たないpUC19のみを有する株においては、クリアゾーンは形成されなかった。また、pUR22及びpUR25を有するJM109株のエステラーゼ活性を測定した。図5-5-Bに示したように、pUR22の培養液は38.3 mU/mlのエステラーゼ活性を示した。一方、pUR25は10.6 mU/mlと部分的にエステラーゼ活性が減少した。

第4節 考察

*E. coli*を宿主としてTB-35株由来の約10 kbpのDNA断片をクローニングした。サブクローニングされた2.5 kbp *Pst* I-*Sph* I断片の塩基配列を決定した結果、この断片には1,644 bp

(A)



E. coli
JM109 / pUC19
JM109 / pUR22
JM109 / pUR25

(B)

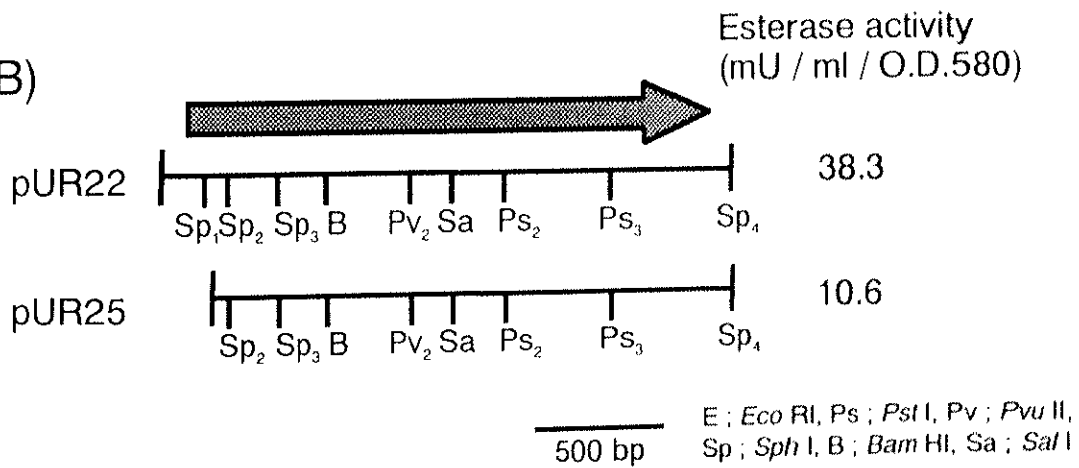


図5-5 pUR22及びpUR25の発現産物の活性

(A)pUR22及びpUR25のクリアーゾーン形成

ポリジエチレングリコールアジペートを乳化させた平板培地に、pUR22及びpUR25を有する *E. coli* JM109を植菌し、37°Cで1晩培養した。コントロールとして、pUC19のみを有する *E. coli* JM109を用いた。

(B)pUR22及びpUR25のエステラーゼ活性

本文中に記した方法で、pUR22及びpUR25を有する *E. coli* JM109のエステラーゼ活性を測定した。

からなるORFが含まれていた。このORFには、TB-35株由来のPURエステラーゼのN末端アミノ酸配列及びポリペプチド内部のアミノ酸配列（第4章）に相当する塩基配列が含まれていた。またORFを含むpUR22を有する*E. coli*においてエステラーゼ活性及びポリジェチレングリコールアジペート分解活性が認められた。これらの結果より、クローニングされたORFはTB-35株由来のPURエステラーゼ（PudA）をコードしていることが示された。また、エステラーゼ、リパーゼ、セリンプロテアーゼ等の活性中心に保存されている配列、-Gly-Xxx1-Ser-Xxx2-Gly-（リパーゼボックス）に相当する配列が197番目から201番目（-Gly-Glu-Ser-Ala-Gly-）に見られた。このことより、本酵素は199番目のSerを活性中心のひとつとするエステラーゼであることが示唆された。本遺伝子の翻訳開始点上流に大腸菌における-10及び-35領域に相当する配列が、終始コドンの下流に ρ -independent terminatorに特徴的なステムループ構造とAT含量の高い領域が存在したことより、本遺伝子は単独で転写されていることが推察された。ORFのGC含量は63.4%であり、実験により求めたTB-35株の全DNAのGC含量（68.8%）よりやや低い値を示した。*Comamonas* 属細菌の使用するコドンは、3番目の塩基がグアニンまたはシトシンである確率が高いことが知られているが、本遺伝子においても3番目の塩基がグアニンまたはシトシンである確率は78.9%と高く、同様の傾向が見られた。

決定された塩基配列より本酵素の一次配列を推測した結果、本酵素は26残基のアミノ酸からなるシグナルペプチドを有し、プロセッシング後のタンパク質の分子量は約55,110 Daであった。TB-35株由来のPURエステラーゼの分子量は約62,000 Daであり、一次配列より計算した分子量とは約7,000 Daの差異が認められた。このような差異が生じた要因は不明であるが、PURエステラーゼの特徴的な構造が、SDS-PAGE及びゲル濾過クロマトグラフィーの結果に影響を与えたのではないかと考えられた。

pUR22を有する形質転換体はエステラーゼ活性を有し、PURのポリエステル部位を構成するポリジェチレングリコールアジペートを分解した。しかし、IPTGによる誘導と同時に菌の生育が停止してしまうことから、本酵素の菌体内への大量蓄積は宿主に致命的な影響を与える可能性が考えられた。翻訳開始点から43アミノ酸残基を欠損したpUR25では、エステラーゼ活性は部分的に残存していたものの、ポリジェチレングリコールアジペート

は分解しなかった。pUR25では発現した酵素が菌体内に蓄積したため、プレート上では活性が確認できなかったと考えられた。pUR22では発現産物によって菌体が死滅し、菌体内に蓄積されていたエステラーゼが放出された結果、プレート上でポリジェチレングリコールアジペートが分解されたものと考えられた。

PURエステラーゼを発現した*E. coli*の菌体破碎液はPURを分解したが、親株であるTB-35株由来の酵素と比較すると低活性であった。菌体破碎液には*E. coli*由来の夾雑タンパク質が多く混在しているため、組換型酵素の性質をより詳細に検討するためには、さらに精製が必要であると考えられた。