

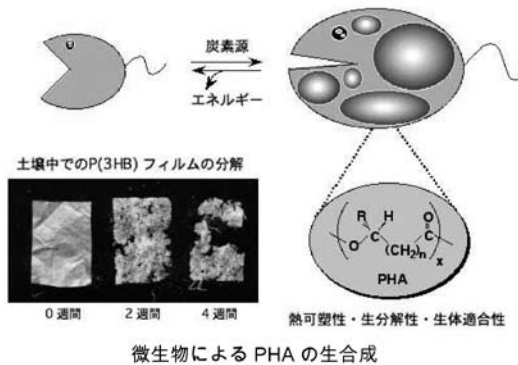
# ゲノム情報に基づいた高性能バイオポリエステル生産微生物の分子育種

●福居 俊昭<sup>1)</sup> ◇福崎 英一郎<sup>2)</sup>

1) 東京工業大学大学院生命理工学研究科 2) 大阪大学大学院工学研究科

## <研究の目的と進め方>

プラスチックは安価で加工しやすく、耐久性にも優れていることから、現代社会では広範囲に使用される必須素材である。その反面、自然環境の中でほとんど分解されないために廃棄された場合や環境に流出した場合の処理が世界的な問題となっている。微生物の中にはエネルギー貯蔵物質として(R)-3-ヒドロキシアルカン酸のポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を合成し蓄積するものが数多く知られている。このポリエステルは環境中の微生物によって容易に分解資化される生分解性プラスチックであるうえに、生産原料として糖や植物油などのカーボンニュートラルな資源を利用できる。したがってその実用化により持続発展可能型プラスチック産業を確立できる可能性を有している。



代表的な PHA であるポリ((R)-3-ヒドロキシシブタン酸)[P(3HB)]は融点 178℃の熱可塑性高分子であり熔融成形が可能であるが、硬くてろい物性のために構造物材としての実用化は困難である。近年ではバイオマス由来生分解性プラスチックは以前にも増して注目を集めているが、PHA が社会に受け入れられるためにはさらなる物性向上とコストダウンが必須である。

PHA の物性を改善する手段として、微生物に与える炭素源を工夫することにより異なる構造のモノマーユニットがランダムにポリエステル鎖に導入された共重合体とすることが試みられてきた。一例として、P(3HB)生産菌に糖質と共にプロピオン酸やペンタン酸を含む混合炭素源を与えると(R)-3-ヒドロキシペンタン酸を含む共重合体が合成される。このような共重合体は一般にP(3HB)ホモポリマーより優れた物性を有するが、混合炭素源の高コストが問題点であった。

そこで本研究では人工代謝経路によって高物性な共重合ポリエステルをバイオマスのみから生合成可能な微生物株を開発する。さらに、ゲノム情報に基づいた生合成経路の改変により組成制御や生産性の向上をはかる。この目的のためには PHA 合成に直接関与する酵素遺伝子の操作だけでは限界があり、宿主の細胞内炭

素代謝・エネルギー代謝の全体像を理解しつつ効果的改変を加えていくことが必要と考えられる。

## <2008 年度の研究計画>

### (1) 人工代謝経路による共重合ポリエステル合成株の確立

物性の優れた共重合 PHA であるポリ((R)-3-ヒドロキシシブタン酸-co-(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸) [P(3HB-co-3HHx)]、およびポリ((R)-3-ヒドロキシシブタン酸-co-3-ヒドロキシプロピオン酸) [P(3HB-co-3HP)]を生合成する人工代謝経路について、モノマー供給系酵素の効率の発現による組成制御などの改善を図る。

### (2) 多様な炭素源資化能を有するポリエステル合成株の構築

食料と供給しない草木系バイオマスから得られるグルコースやペントースを資化可能なポリエステル生産株を構築する。

### (3) ポリエステル生産菌のメタボローム解析

キャピラリー電気泳動-質量分析(CE-MS)によるポリエステル生産菌のメタボローム解析について再現性のよい分析手法を確立する。その後、増殖期および PHA 生合成条件での代謝プロファイルと比較し、PHA 生合成やその制御についての知見を得る。

### (4) ポリエステル生産菌のトランスクリプトーム解析

次世代高速シーケンサーによる転写産物の網羅的解析によって増殖期や定常期と比較して PHA 生合成条件で発現が変動する遺伝子を同定し、PHA 生合成に伴う転写制御について知見を得る。

## <2008 年度の成果>

### (1)人工代謝経路による共重合ポリエステル合成株の確立

前年度までに、P(3HB)生産菌 *Ralstonia eutropha* 野生株の染色体上 PHA シンターゼ遺伝子を相同性組換えにより *Aeromonas caviae* 由来の広基質特異性 PHA シンターゼ遺伝子に特異的に置換した H16C<sub>Ac</sub> 株を作製した。H16C<sub>Ac</sub> 株は大豆油を炭素源として非常に良好に増殖し、従来の組換え株と比較して 2.3 倍の生産性で P(3HB-co-3HHx) 共重合体を生合成したが、3HHx ユニット分率の低下が観察された。そこで染色体に導入する *A. caviae* 由来 PHA シンターゼ遺伝子を、中長鎖基質に対する取り込み能が高いと推定される NSDG 変異体(N149S、D171G)をコードする遺伝子としたところ、高い PHA 生産性を維持しつつ、3HHx 分率に改善が見られた。また、*R. eutropha* ゲノム情報より脂肪酸 b-酸化系中間体からモノマーを供給する(R)-特異的エノイル-CoA ヒドラターゼの新規遺伝子を複数見いだした。これらを導入した組換え株の中にも 3HHx 分率が向上した株が得られた。

一方、前年度までに糖質を原料として P(3HB-co-3HP) 共重合体を生産するための人工代謝経路については、3HP ユニットの分率向上を目指して、外来遺伝子の 1 つである *acs* (プロピオニル-CoA 合成酵素中の 3HP-CoA シンターゼドメイン) の発現系

の見直しや、他微生物種に由来する遺伝子の導入を検討している。

(2) 多様な炭素源資化能を有するポリエステル合成株の構築

*R. eutropha* 野生株である H16 株は糖質としてフルクトースやグルコン酸を炭素・エネルギー源として良好に生育するが、グルコースは資化できない。エネルギーやマテリアルの生産原料として非可食性ソフトバイオマスに由来するセルロースが有望視されており、バイオポリエステルについても同様であるが、そのためにはセルロースを加水分解したグルコースやセロビオースの資化能をポリエステル生産菌が有していなければならない。H16 株がグルコース資化能を示さない理由は明らかにされていないが、ゲノム解析より本株にはグルコース取り込み能を有していないことが示唆された。実際にエタノール発酵菌 *Zymomonas mobilis* 由来のグルコーストランスポーター遺伝子 *glf* を導入した株が低い増殖速度ながらもグルコース資化能を示すことを前年度に明らかにした。一方、本菌にはグルコース資化性変異株が存在するが、その変異点は明らかにされていない。そこでグルコース資化性変異株における推定 GlcNAc 特異的 PTS システムである NagFE ホモログに着目したところ、変異株由来 *nagFE* には一塩基変異が存在することを見いだした。この変異形 *nagFE* を広宿主域ベクターにより H16 株に導入した組換え株は高いグルコース資化能を示し、かつ高効率で P(3HB) を蓄積することを見いだした。さらにグルコース資化能の改善をはかるとともに、ペントース資化能の付与、人工代謝経路導入によるグルコースからの共重合ポリエステル生合成能の付与を目指す。

(3) ポリエステル生産菌のメタボローム解析

PHA 生産菌のメタボロミクスによって細胞内代謝を解析し、また代謝改変の効果を適切に評価することで、望ましい組成の共重合 PHA を効率良く生産する株の開発へと発展することが期待される。前年度までに CE-MS による一斉分析により PHA 代謝に重要なアシル-CoA チオエステルが各種アニオン性代謝物と共に分離同定できることを確認した。また *R. eutropha* 菌体から調整した代謝物抽出液の CE-MS 測定によって、代謝状態の評価が可能であった。その一方で、サンプル調整法の確立が重要であることが示された。今年度は種々の培養条件における代謝物濃度の変化を精密測定するため、<sup>13</sup>C 安定同位体で標識した代謝物抽出液を内部標準とすることによる相対定量法の確立を行った。

4) ポリエステル生産菌のトランスクリプトーム解析

PHA 生産菌のトランスクリプトーム解析を行い、メタボローム解析と組み合わせて PHA 生合成およびその制御について知見を得ることを試みた。各種条件で培養した *R. eutropha* のトータル RNA から rRNA 特異的プライマーを結合したビーズを用いて rRNA を除去した後に、ランダムプライマーを用いて cDNA を合成し、Solexa Genome Analyzer II によりシーケンシングした。rRNA の除去が不十分であったが、rRNA 以外のタグ配列を解析したところ、リボソームタンパク質遺伝子の増殖期における高い転写など、培養条件により転写量が変動した遺伝子が多数見出された。アセチル-CoA からの P(3HB) 生合成経路を構成する *phaCAB* オペロンの転写には培養条件による大きな変化はなかった一方で、細胞内で PHA 顆粒に結合する phasin タンパク質遺伝子 *phaP* の転写は定常期に大きく減少していた。

<国内外での成果の位置づけ>

ポリエステル生産微生物のメタボローム解析やトランスクリプトーム解析はこれまでに報告例がなく、網羅的解析の有用物質生

産への応用といった観点からも重要である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

CE-MS 解析によって実際の菌体サンプルから各種アシル-CoA 中間体を含む多くのアニオン性代謝物の一斉分析を行うことができたが、真核生物と比較して細菌では代謝が非常に速く、そのメタボローム解析には困難が伴う。効果的に代謝を止めて再現良く代謝物を抽出できるサンプル調製法や定量法について、さらなる改善が必要である。

<今後の課題>

今年度までに、ポリエステル生合成の遺伝子操作において優れた宿主と成りうる株や、新規な人工代謝系による共重合ポリエステル生合成株を作製するとともに、メタボローム解析およびトランスクリプトーム解析の確立を進めてきた。今後、共重合 PHA 生合成経路の改善、多様な炭素源を資化する代謝経路の付与やエネルギー代謝の改変を進めていく。また作製した株について種々の培養条件で取得した代謝プロファイルや転写プロファイルを野生株や他の組換え株と比較することによって代謝改変による効果を評価し、その結果をふまえた改変を加えていく。最終的には組成や分子量が制御され、物性が優れた共重合ポリエステルを効率良く生産する微生物株を確立し、ゲノム情報を基盤として持続発展可能プラスチック産業の創生に貢献することを目指す。

<共同研究の状況>

比較ゲノム支援班によりトランスクリプトーム解析にご支援いただきましたことに深謝いたします。

<成果公表リスト>

1. 0901151434 福居俊昭、バイオマスを単一原料とした共重合ポリエステルの微生物合成、バイオインダストリー 25:66-72 (2008)
2. 0805231553 Mifune, J., Nakamura, S., Fukui, T. Targeted engineering of *Cupriavidus necator* Chromosome for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil, Can. J. Chem. 86: 621-627 (2008)
3. 0805280944 福居俊昭、画期的なバイオマス生分解性プラスチック～微生物使用で脱石油依存～、国際技術情報 M&E 3月号、p18-19
4. 0804221403 柔軟性高い生分解性プラスチック：微生物のみから作製、日経産業新聞 2008年1月9日
5. 0805231546 岩澤玲子、折田和泉、福居俊昭 *C. necator* にグルコース資化性を付与する方法、およびその形質転換体を用いた PHA の製造方法、特願2008-050655
6. 0704281710 福居俊昭、鈴木麻美絵、共重合ポリエステルの製造法、特願2007-057269