

# 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

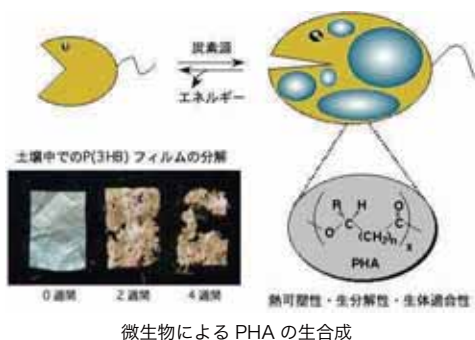
●福居 俊昭

東京工業大学大学院生命理工学研究所

## <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。地球環境への負荷を軽減させるためにはプラスチック廃棄物のリサイクリング技術の開発とともに、自然界の微生物によって分解される生分解性高分子素材の開発と実用化が望まれる。

微生物の中にはエネルギー貯蔵物質として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。



微生物による PHA の生合成

代表的な PHA であるポリ ((R)-3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)]は融点 178°Cの熱可塑性高分子であり溶融成形が可能であるが、硬くてもろい物性のために構造材料としての実用化は見送られてきた。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。

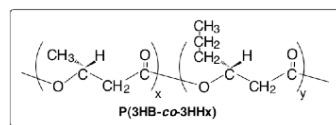
PHA の物性を改善する手段として、微生物に与える炭素源を工夫することにより異なる構造のモノマーユニットがランダムにポリエステル鎖に導入された共重合体とすることが試みられてきた。一例として、P(3HB)生産菌に糖質と共にプロピオン酸やペンタン酸を含む混合炭素源を与えると (R)-3-ヒドロキシペンタン酸を含む共重合体が合成される。このような共重合体は一般に P(3HB)ホモポリマーより優れた物性を有するが、混合炭素源の高コストが問題点であった。

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。

## <2007 年度の研究の当初計画>

様々な構造・組成の PHA の解析から、我々は 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) ユニットを



ベースとした共重合体が材料として優れていることを見出している。これまでに基質特異性の広い PHA シンターゼをコードする *Aeromonas caviae* 由来 *phaC* を用いて、油脂・脂肪酸や糖質から柔軟な共重合ポリエステルであるポリ ((R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-(R)-3-ヒドロキシヘキサ酸) [P(3HB-co-3HHx)] を蓄積する組換え微生物を作製した。本年度は昨年度までに作製した P(3HB-co-3HHx)合成組換え株の詳細について検討するとともに、バイオマスを単一原料としたバイオポリエステル生合成株の構築に適した宿主株の開発、およびポリエステル生産微生物のメタボローム解析の確立を行う。

## <2007 年度の成果>

### 1) 共重合ポリエステル合成能を有する組換え株の構築

水素細菌 *Ralstonia eutropha* H16 株は P(3HB)ホモポリマーの効率的生産菌であり、多くの研究例がある。また本株の変異源処理により得られたポリエステル合成能欠損変異株 PHB4 株は、PHA 合成を目的とした遺伝子操作における宿主としてよく用いられている。しかし PHB4 株においては変異部位が明らかでなく、増殖能も野生株より劣る。昨年、*R. eutropha* H16 株のゲノムが解明されたことから、H16 株を元とし、今後の検討において基盤とすることができる宿主株の構築を行った。まず H16 株染色体上の PHA シンターゼ遺伝子を広基質特異性の *A. caviae* 由来 *phaC* 遺伝子に相同性組換えにより特異的に置換した。得られた H16Cac 株は 1% 大豆油を炭素源として良好に増殖し、菌体収量は野生株の 1.4 倍、PHB4 株由来組換え株の 1.9 倍となった。さらにポリエステル蓄積量は乾燥菌体重量あたり 89 wt%に達した。しかし本株による P(3HB-co-3HHx)共重合体中の 3HHx 分率は 0.7 mol%と、PHB4 株由来組換え株による分率 (2.7 mol%) と比較して低下が見られた。PHB4 株の *phb* オ

ペロンの配列決定から、PHA シンターゼ遺伝子 *phbC* にナンセンス変異が同定された。その下流の  $\beta$ -ケトチオラーゼおよび NADPH-アセトアセチル-CoA レダクターゼの遺伝子には変異は見出されなかったが、両酵素の活性が著しく低下していた。さらに組換え株の解析より、菌体内における  $\beta$ -ケトチオラーゼ活性の高い株においては 3HHx 分率が低下する傾向が見られた。これらの知見は新たな改変戦略の策定につながる事が期待される。

また前年度に引き続き、*Escherichia coli* を宿主とした P(3HB-co-3HHx) 生合成経路の構築を試みているが、設計した (R)-3HHx-CoA ユニット生合成経路で機能させる外来酵素遺伝子の発現不足が問題となっており、発現系の見直しを行っている。

### 2) 多様な炭素源資化能を有するポリエステル生産用組換え株の構築

*R. eutropha* 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。*R. eutropha* がグルコース資化能を有さない理由は明らかにされていないが、ゲノム解析の結果からグルコース取り込み能が欠失していることが示唆された。そこでエタノール発酵菌 *Zymomonas mobilis* 由来のグルコーストランスポーター遺伝子 *glf* を広宿主域プラスミドにより導入した組換え株を作製し、増殖能を検討した。その結果、本組換え株は低い増殖速度ながらもグルコース資化能を示し、2% グルコースから乾燥菌体重量あたり 80 wt% の P(3HB)ホモポリマーを蓄積した。今後はグルコーストランスポーター遺伝子の高発現による増殖能の向上や、さらには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) 共重合ポリエステル合成菌のメタボローム解析

PHA 生産菌のメタボローム解析においては通常の代謝物に加えて、重合における直接のモノマーとなる (R)-3-ヒドロキシアシル-CoA ((R)-3HA-CoA)、およびその関連代謝物である各種鎖長・構造のアシル-CoA チオエステルについて同定と定量を行う必要がある。しかし中長鎖のアシル-CoA チオエステルは市販されていないことから、分析の標品とできるアシル-CoA の合成を行った。これまでに化学的手法と酵素変換の組み合わせによる合成を行い、炭素数 4-12 までの各種アシル-CoA 精製標品を調製した。さらに大阪大学大学院工学研究科・福崎教授との共同研究により、*R. eutropha* 菌体サンプルのキャピラリー電気泳動-質量分析 (CE-MS) による一斉分析で、各種アニオン性代謝物と共にこれらアシル-CoA チオエステルの分離同定および定量が可能であることを確認した。オクタン酸を炭素源として生育させた菌体の解析では低い濃度の *n*-アシル-CoA や 3HA-CoA が検出されたが、3-ケトアシル-CoA は全く検出されないなど、脂肪

酸  $\beta$ -酸化系に関する興味深い知見が得られた。しかし測定の実現性が必ずしも良くなく、さらにはサンプル調製法 (集菌方法、洗浄液組成など) の違いによって定量結果が大きく異なる代謝物も存在したことから、サンプル調整法の確立が重要であることが示された。

### <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は未だ例がなく、メタボローム解析の有用物質生産への応用といった観点からも興味深いと考えられる。

### <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、サンプル調製法の違いによる測定値の差が見られた。真核生物と比較して代謝が非常に速い微生物におけるメタボローム解析は困難さが伴うが、効果的に代謝を止め再現良く代謝物を抽出できるサンプル調製法の確立が必要である。

### <今後の課題>

今年度までに、今後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、メタボローム解析の確立へと進めてきた。来年度以降、実際に作製した株について種々の条件で培養を行い、PHA 生合成期における代謝物の種類・濃度の経時変化や、PHA 非合成期との比較によって PHA 生合成の際の代謝全体について理解するとともに、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た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旨とする。

### <成果公表リスト>

特許

.070428 7 0

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