

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710087

研究課題名 (和文) 新規乳酸ポリエステルを合成する遺伝子組換え植物の創出

研究課題名 (英文) Production of lactate polymer in the transgenic plants

研究代表者

松本 謙一郎 (MATSUMOTO KENICHIRO)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：80360642

研究成果の概要 (和文)：

ポリ乳酸は、微生物発酵によって合成される乳酸を重合させたバイオマス由来のプラスチックである。申請者らは、乳酸を重合可能な特殊な重合酵素を導入した遺伝子組換え植物を作成し、植物細胞内による新奇ポリエステル合成を検討した。この目的のために、ポリエステルの合成に必要なモノマー供給および重合酵素の遺伝子を導入した組換え植物を作成した。また、導入した遺伝子の発現と、ポリエステル合成を確認できた。

研究成果の概要 (英文)：

Polylactic acid is a biobased polyester, which is synthesized from fermentative lactate. We attempted to synthesize lactate-incorporated polymer using the transgenic plants. To meet this goal, the gene encoding the monomer supplying enzymes and polymerase were introduced into plants. The expression of these genes and polyester synthesis were confirmed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：環境技術・環境材料

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：バイオポリマー、組換え植物、乳酸

1. 研究開始当初の背景

ポリ乳酸は、バイオマスを原料として合成される代表的なバイオプラスチックである。ポリ乳酸は、加工性・透明性に優れることから、使い捨てのコップや、食品包装材などとしてすでに実用化されている。石油の大量消費による資源・環境問題が叫ばれる中、ポリ乳酸のように再生可能なバイオマスを原料として作られるプラスチック材料の重要性が高まっている。

ポリ乳酸の合成は、次に述べるような多段階ステップにより構成される。第一にトウモロコシなどの植物を栽培し、デンプンを収穫する。次に、デンプンなどの糖類を、加水分解してグルコースを得た後、これを炭素源として乳酸菌を用いて発酵させることにより乳酸を合成する。合成された乳酸は、精製して不純物を除去した後、縮合してオリゴマーを得る。このオリゴマー合成の段階では、高分子量のポリマーを得ることが出来ないため、一度環状のラクチドに変換した後、重金

属触媒を用いて開環重合させることにより、高分子量のポリ乳酸が得られる。

しかし現状では、ポリ乳酸は石油プラスチックに比べて生産コストが高く、普及を妨げている主要因となっている。コストが高くなる理由として、ポリ乳酸ができるまでに、上述したような多段ステップが必要で、プロセスが複雑であることが挙げられる。さらにもう一つの問題点として、重合の際に用いる触媒が有害であり、食品の包装材料や、医療用材料として使用する際には、触媒除去のためのプロセスが必要であることも指摘されている。

一方で、微生物が直接ポリエステルを合成する系が知られている。ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) と総称されるポリエステルは、ある種の微生物によって炭素源の貯蔵物質として合成・蓄積される。最も典型的な PHA は、3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) をモノマーユニットとする P(3HB) である。P(3HB) はポリ乳酸と類似した化学構造を有するが、不透明で脆い物性を持つことから、物性は大きく異なっている。P(3HB) の生合成は、アセチル CoA からモノマーとなる 3HBCoA を合成するモノマー供給系と、3HBCoA をポリマーへと重合する重合酵素からなる。モノマー供給系は、最も典型的には、 β ケトチオラーゼによるアセチル CoA のアセトアセチル CoA への二量化反応と、アセトアセチル CoA 還元酵素による、3HB-CoA への還元反応からなる。PHA 重合酵素は、3HBCoA から CoA を遊離し、連続的にエステル結合を形成する事により、ポリエステルを合成する。本酵素は、3-ヒドロキシ酪酸の CoA 体に基質特異性があり、乳酸のように 2 位に水酸基を有する物質は重合できないと考えられていた。

最近、我々の研究グループでは、乳酸を細胞内で重合できる、画期的な改変型ポリエステル重合酵素を発見した。本酵素は、ポリエステル合成酵素の改変体であり、通常天然の酵素では見られない、乳酸の CoA 体であるラクチル CoA の重合活性を有する。ラクチル CoA は、CoA 転移酵素によって合成可能であることが報告されていた。CoA 転移酵素は、アセチル CoA を CoA 供与体として、乳酸との間で転移反応を起こす事により、ラクチル CoA を合成していると推定された。申請者らは、この特殊な重合酵素と CoA 転移酵素を用いて組換え大腸菌によるポリマー合成を試み、実際にグルコースを炭素源として、乳酸が重合したポリエステルを合成することができた。このポリマーは、ポリ乳酸のような透明性を持ちつつ、ポリ乳酸にはない柔軟な物性を示したことから、新たな性質をもつバイオポリマーが合成された事が分かった。さらにこの結果は、これまでバイオプロセスと化学プロセスを経て合成されていた乳酸ポリマーが、バ

イオプロセスのみにてワンステップ合成できることを意味している。さらに、完全生合成により合成されるポリマーには、有害な重金属触媒が含まれないため、安全性が重視される用途には有用である。

2. 研究の目的

本研究課題では、この系をさらに遺伝子組換え植物に持ち込むことにより、一段階のバイオプロセスによるバイオプラスチック生産系の確立を目指した。遺伝子組換え植物では、光合成によるバイオマス生産と微生物発酵を一つの宿主内で行うことができるため、植物栽培により生産した炭素源を微生物で発酵させる系よりも少ない工程でポリマー生産を行うことができるため、植物によるポリマーの直接生産系が実現すれば、より省エネルギー低コストでの物質生産が可能になる。

我々は、これまでの研究により、微生物から単離したポリエステル合成遺伝子をシロイヌナズナなどの植物に導入した組換え体を作成し、光合成によりポリエステルの生産が可能であることを示している。さらに、微生物の系を用いて作成されたポリエステル合成系の酵素群の改変体を植物に導入する事により、微生物を宿主として見られる酵素の機能変化が、植物細胞内でも同様に見られることを見出していた。この事から、前述した乳酸ポリマーの生合成系も、植物で機能させることが可能であると期待された。そこで本課題では、そのためのステップとして、ポリエステル合成に必要な遺伝子の植物細胞内での機能的発現を検討した。

3. 研究の方法

ポリマーの生合成に必要な酵素群 (モノマー供給酵素と重合酵素) を植物細胞内で機能させるためのベクターを構築し、アグロバクテリウム法を用いて植物細胞内に導入した。プロモーターは、多くの植物で恒常的に発現することがよく知られているカリフラワーモザイクウイルス由来の 3'5S プロモーターを用いた。目的遺伝子を導入したアグロバクテリウムと植物を共存培養した後、植物を、カナマイシンを含む培地で培養した。数週間の栽培の後、抗生物質耐性を有する組換え植物の候補を単離した。得られた植物を、人工気象基を用いて MS 培地上で無菌的にさらに数週間生育した。定法に従って植物から RNA を抽出した後、逆転写を行い、全 mRNA の cDNA を得た。これを用いて、導入されたポリエステル合成系遺伝子の発現を RT-PCR で確認し、目的遺伝子が発現する組換え体を選抜した。また、植物体をバッファー中で破碎し、不要画分をろ過することにより、粗抽出液を調整

した。この抽出物を用いて、導入遺伝子の遺伝子産物であるタンパク質（酵素）の生産をイムノブロットにより確認した。その結果、遺伝子から予想されるサイズに、特異的なバンドを観察することができた。さらに、組換え体を数カ月生育し、得られた植物体を収穫して、凍結乾燥した。乾燥植物体を粉碎した後、クロロホルム抽出に供し、細胞内蓄積したポリエステルを単離した。得られたポリマーサンプルを精製した後に塩酸エタノール中で加熱する事により、エチルエステルへと変換した。得られた誘導体を GCMS 分析に供し、ポリマーの組成と蓄積率を分析した。

微生物と植物は、同じ遺伝暗号を用いているが、コドンの使用頻度が異なり、その結果、微生物由来の遺伝子を植物で発現させる際に、発現効率が低くなる事があることが指摘されていた。そこで、植物細胞内での遺伝子の発現量を増大させるため、コドン使用頻度を最適化した遺伝子を作成し、それを導入した組換え株を作成する事により、酵素量およびポリマー量の増大を図った。上述の実験と同様に、ポリマーの蓄積率を GCMS 分析で決定した他、タンパク質の発現量をイムノブロットにより定量した。加えて、遺伝子の発現量の変動していない事を確認するため、上述した方法と同様に、cDNA を調整し、リアルタイム PCR 法を用いて、導入遺伝子の発現量を定量した。

4. 研究成果

代表的な微生物産生ポリエステルであるポリヒドロキシ酪酸を合成する酵素遺伝子群を導入した組換え株を作成し、遺伝子の発現およびポリマーの合成を確認した。このことにより、外来遺伝子の導入方法、およびポリマー合成系・分析系が期待通りに作動することが確認できた。

さらに、コドンの使用頻度を植物での発現に最適化した遺伝子を用いて、酵素の発現量およびポリマー合成量を測定したところ、酵素の発現量が高まることが確認され、さらに発現量の増加に伴い、ポリマー合成量が共に3倍程度に増加することが分かった。また、リアルタイム PCR 分析の結果、コドン最適化遺伝子は、野生型酵素と比較して、mRNA への転写量が統計的に増加していない事が分かった。このことから、コドン最適化により、mRNA からタンパク質への翻訳過程が改善された事が分かった。

これらの結果は、コドン使用頻度の不適合が物質生産の障害になっている事、また、外部から導入した遺伝子がコードしている酵素の活性が、物質生産量を決めるファクターの一つになっている事を示していた。モノマー供給系の酵素であるアセトアセチル CoA リ

ダクターゼと重合酵素の両方を、コドン最適化を行ったが、ポリマー蓄積率の増大効果が見られたのは、アセトアセチル CoA リダクターゼのみであった。このことから、アセトアセチル CoA リダクターゼの活性が植物細胞内で P(3HB)の合成量を決めるファクターになっている事が分かった。

また、植物細胞内で乳酸を合成するための乳酸脱水素酵素遺伝子を導入した組換え株を作成した。この組換え体は、生育障害を示さず生育し、上記の方法により目的遺伝子の導入と発現を確認できた。次に、モノマー供給系酵素である転移酵素を植物に導入し、タンパク質の発現をイムノブロットにより確認できた。さらに、得られた組換え植物から抽出したポリマーの GCMS 分析において、ポリエステルの蓄積を示すピークの溶出時間とマススペクトルが標準物質と一致したため、植物細胞内でのポリエステルの合成を確認することができた。これらにより、植物で乳酸ポリマーを合成するための基盤技術が構築できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Ken'ichiro MATSUMOTO, Kenjiro MORIMOTO, Aoi GOHDA, Hiroaki SHIMADA, Seiichi TAGUCHI, Improved polyhydroxybutyrate (PHB) production in transgenic tobacco by enhancing translation efficiency of bacterial PHB biosynthetic genes, *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 111(4), pp. 485-488, 2011. 査読あり

② Ken'ichiro MATSUMOTO, Ayako ISHIYAMA, Kohei SAKAI, Tetsufumi SHIBA, Seiichi TAGUCHI, Biosynthesis of glycolate-based polyesters containing medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli* expressing engineered polyhydroxyalkanoate synthase, *J. Biotechnol.*, Vol. 156(3), pp. 214-217 2011. 査読あり

[学会発表] (計7件)

森本 健二郎、合田 葵、松本 謙一郎、島田 浩章、田口 精一：“PHB 生合成系酵素群の発現効率化による組換え体タバコでの PHB 生産性の向上”、農芸化学会北海道支部 学術講演会、2009、札幌。

Ken'ichiro Matsumoto: “Expansion of Biological Polyesters by Engineering of

Microbial Polyester Synthase” : 2009
Taiwan-Japan Biateral Polymer Symposium,
2009, Tiwan.

Ken'ichiro MATSUMOTO, Miwa YAMADA, Fumi
SHOZUI, Shu URAMOTO, Ren MOTOHASHI,
Takanori NAKAI, Kotaro SHIMIZU, Seiichi
TAGUCHI: "Engineered enzymes and pathways
for production of lactate-based
polyesters": International Conference on
Cellular & Molecular Bioengineering 2,
Nanyang Technological University, 2010,
Singapore.

大場 貴史、江口 綾、森本 健二郎、本橋 廉、
松本 謙一郎、田口 精一：“高活性化 PhaB の
導入による組換えタバコでの PHB 生産性の向
上”、日本農芸化学会大会、2011、京都。

大場貴史、江口綾、森本健二郎、本橋廉、松
本謙一郎、田口精一：“進化型 PhaB による組
換えタバコにおける PHB 生産性増強”、日本
生物工学会大会、2011、東京。

石山絢子、松本謙一郎、田口精一：“組換え
大腸菌による乳酸およびグリコール酸ベ
ース新奇バイオプラスチックの生合成”、日本
生物工学会大会、2011、東京。

斯波哲史、石山絢子、松本謙一郎、田口精一：
“乳酸およびグリコール酸ベ
ース新奇バイオプラスチックの微生物生産”、農芸化学会
北海道支部 学術講演会、2011、札幌。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.eng.hokudai.ac.jp/lab/seika/>
[TOP.html](#)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 謙一郎 (MATSUMOTO KENICHIRO)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：80360642

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者