

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14689

研究課題名(和文) リンの酵素的酸化反応を利用した二酸化炭素からのポリエステル微生物合成

研究課題名(英文) Cofactor supply for bacterial cell growth and polyhydroxyalkanoate synthesis concomitant with enzymatic oxidation of phosphite

研究代表者

柘植 丈治 (Tsuge, Takeharu)

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：70332260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、水素細菌の高い二酸化炭素資化能に着目して、水素以外の物質から還元力を供給する仕組みを開発することで、水素細菌を安全にかつ独立栄養的に培養することを目的とした。水素の代わりに我々が注目したのが、リンの酸化反応であり、これによって得られる還元力で、水素細菌が二酸化炭素を固定してバイオポリエステル(PHA)を合成するのかを調査した。その結果、リンの酸化によって得られた還元力を二酸化炭素固定とPHA合成の両方に利用させることはできなかったものの、大腸菌を宿主に用いた場合に、得られた還元力をPHA合成に利用させることは可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, the effect of NADPH supply on bacterial cell growth and polyhydroxyalkanoate (PHA) production was investigated using a phosphite dehydrogenase double mutant, which catalyzes oxidation of phosphite to phosphate with the generation of NADH and NADPH. In an in vitro assay using purified enzymes, PHA polymerization was observed only when phosphite and the double mutant enzyme were present, confirming that NADPH was supplied for PHA synthesis. In an in vivo assay, the presence of phosphite and the double mutant enzyme did not influence the yield of PHA under normal growth conditions. However, PHA yield increased 3.2-fold in non-growing cells compared to the control, suggesting that NADPH generation is coupled with PHA biosynthesis.

研究分野：高分子生合成

キーワード：亜リン酸 補酵素 ポリエステル合成

1. 研究開始当初の背景

大気中の二酸化炭素濃度は確実に増加傾向にあり、二酸化炭素などの温室効果ガスによる地球温暖化とそれに起因する環境問題が世界各地で多発している。これらの問題の解決には、化石資源に依存している現在の産業基盤を改め、二酸化炭素を資源化することが急務である。

現在の日本では、火力発電所や製鉄所などのプラントから膨大な量の二酸化炭素が排出されている。このように排出される二酸化炭素は、化学吸収法より分離し再資源化するか、生物により固定化するか、地下または海洋で貯留する方向で対策法が検討されている。

二酸化炭素の再資源化のなかでも、生物固定化は、生物の代謝機能を活用することで高付加価値物質に変換することができるため、非常に魅力的な手段のひとつである。多くの研究者が藻類やラン藻による二酸化炭素の固定化について研究を行っているが、太陽光を必要とするためリアクターは平面的で広い面積を要する。そのため解放系での培養を余儀なくされ、遺伝子改変した組換え株を用いることが難しい。

一方で水素細菌は、化学合成独立栄養細菌の一つで、高い二酸化炭素固定能、高い増殖速度、そして、その細胞内に 80% 以上の含有率でバイオポリエステル(PHA)を合成する。水素細菌は、光エネルギーを要しない代わりに、水素を酸化して二酸化炭素の固定を行う。ラン藻などとは異なり、密閉した小型リアクターで培養でき、管理が容易で、組換え株の利用も可能である。

実際に、水素、酸素、二酸化炭素からなる混合ガス下において水素細菌である *Ralstonia eutropha* の独立栄養培養が研究され、非常に高い二酸化炭素固定能力と PHA 生産性が示されてきた。しかし一方で、水素の取り扱いが難しく、実験には常に水素の漏洩に伴う爆発の危険があった。

2. 研究の目的

本課題では、水素細菌の高い二酸化炭素資化能に着目して、水素以外の物質から還元力を供給する仕組みを開発することで、水素細菌を安全にかつ独立栄養的に培養することを目的とした。水素の代わりに我々が注目したのが、リンの酸化反応であり、これによって得られる還元力で、水素細菌が二酸化炭素を固定して PHA を合成するのかを調査した。

3. 研究の方法

水素細菌の独立栄養培養は、二酸化炭素を直接原料として利用でき、かつ、生分解性プラスチックとして利用できる PHA を合成できるため、物質生産における最も理想的な形態である。しかし、唯一の問題点は二酸化炭素固定の還元力として供給する水素の取り扱いが難しい点である。本研究では、水素に

代わる還元力としてリンに着目した。しかし、現在までにこのような発想で行われた研究はなく、リンの酸化による独立栄養培養の実現性は未知数であった。そこで、リンの酸化反応によって得られる還元力で、水素細菌が二酸化炭素を固定して PHA を合成するのかを以下の手順にて調査した。

亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) 遺伝子のクローニングと変異体の作成：まず、本研究における肝となる部分は、亜リン酸を介した PtxD による補酵素 NADH の供給である。PtxD 遺伝子は、最も研究が進んでいる *Pseudomonas stutzeri* のものを使用し、コドンが大腸菌に最適化した状態で人工合成した。一方で、PHA 合成には NADPH が必要となる。本来、PtxD は基質として NAD^+ への触媒活性を示すが、175 番目のグルタミン酸がアラニンへ、176 番目のアラニンがアルギニンへと置換された二重変異体 PtxD_{EAAR} は、 NAD^+ だけでなく NADP^+ にも触媒活性を示すようになる。そこで、PtxD_{EAAR} を作成し、NADPH も供給することで PHA 生産を強化することを試みた。

PtxD 発現ベクターの構築：本実験では、水素細菌の中でもゲノムが解読されており、かつ、最も研究が進んでいる *R. eutropha* H16 株を使用した。また、プラスミドベクターとしては、広宿主域ベクターである pBBR1MCS-2 を使用して、PtxD および PtxD_{EAAR} の発現系を構築した。一方で、*R. eutropha* は亜リン酸の取り込みができない可能性も考えられるので、亜リン酸トランスポーター (PtXABC) についても発現系を構築した。

PtxD の発現確認および酵素活性測定：大腸菌を用いた PtxD 発現を作成し、過剰発現の後、ニッケルアフィニティーカラムを用いて PtxD を精製した。SDS-アクリルアミドゲル電気泳動を行い、適正に発現が行われていることを確認した。次に、精製酵素を用いて、酵素活性を確認した。この反応は亜リン酸からリン酸を生成する際に、補酵素 NAD^+ を NADH に還元するので、NADH の生成を 340 nm の吸収変化で追うことで、酵素活性を確認した。一方で、反応液中の亜リン酸の消費量とリン酸の生成量は、キャピラリー電気泳動で分析を行い、リンの酸化反応が正しく進んでいるかを確認した。PtxD_{EAAR} については、速度論解析を行い、NADPH に対する親和性および触媒効率を調べた。一方で、*R. eutropha* で発現させた場合は、粗酵素液を調製し、PtxD 活性の確認を行った。

独立栄養条件下での培養：独立栄養培養は、最初にプラスチック製のパウチ袋に寒天プレートを用いた固体培養系で行った。二酸化炭素を 8% 程度に制御した好気条件下にて、組換え株が亜リン酸を入れた無機培地にて生育するかを調べた。また、同様の実験をヘッドスペースガス組成を制御した液体培養にて行い、水素が存在しない独立栄養条件下で生育が可能かを調べた。

4. 研究成果

本提案課題では、リンの酵素的酸化反応を利用して微生物細胞内での補酵素再生系を強化し、PHA 合成の効率化および二酸化炭素の資源化を試みることを目的としている。

初年度（平成 27 年度）は、NADH および NADPH の両補酵素をリンの酸化反応を利用して再生するために、両補酵素に対して高い活性を示す酵素変異体 P_{TXD}E_{EAAR} を作成した。この変異体酵素を発現させるためのプラスミドを構築し、まずは大腸菌内で機能的に作用するかを確かめた。組換えた大腸菌を培養しゲル電気泳動により分析したところ、目的サイズのタンパク質の発現が認められた。また、酵素活性測定を行い、目的とする酵素活性を検出することができた。さらには、組換え大腸菌の培養において、培養液をキャピラリー電気泳動で分析し、リンの酵素的酸化反応に由来する反応生成物（リン酸）の存在を確認した。これらのことより補酵素の再生系が構築できていることを確認した。

平成 28 年度は、インピトロ系においてリンの酸化を利用した補酵素再生系を構築し、まずはモノマー供給に係るレダクターゼ PhaB とリンクさせ、モノマーの合成反応が進行するのかを調べた。その結果、インピトロ系では正常に機能し、リンを酸化することでモノマーを合成する還元力が供給されることを確認した。次に、この補酵素再生系を PHA 合成細菌である水素細菌に導入し、インピボ系における補酵素再生の強化を試みた。しかしながら、キャピラリー電気泳動で培養液の生成リン酸濃度を確認したところ、その量は微量であり、リンの酵素的酸化が想定していたほど進行していないことが明らかになった。すなわちこの結果は、補酵素再生が僅かにしか強化されていないことを意味している。また、水素細菌は二酸化炭素を直接資化することができるが、補酵素再生を強化することによる二酸化炭素の資化促進を確認することができなかった。

最終年度（平成 29 年度）は、宿主を大腸菌に変更し、補酵素再生強化により宿主の代謝にどのような影響を及ぼすのかを調べた。まず、大腸菌における発現系を構築し、インピボ系でも NAD⁺ および NADP⁺ が基質として再生されることを確認した。次に、PHA 合成とリンクさせ、グルコースからの PHA 収率が向上するかどうかを調べた。その結果、窒素源を欠乏させた培養条件において、対糖収率が 3 倍程度向上することを確認した。よって、リンの酸化によって得られた還元力が PHA 合成に利用されたことを示すことができた。計画当初はリンの酸化によって得られた還元力を二酸化炭素固定と PHA 合成に利用することが目的であったが、両目的の同時達成はできなかったものの、PHA 合成に利用する目的は達成することができた。

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 1 件)

Miyahara, Y., Oota, M., Tsuge, T.:
NADPH supply for poly(3-hydroxybutyrate) synthesis concomitant with enzymatic oxidation of phosphite, *J. Biosci. Bioeng.*, in press.
(DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.05.026) 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

宮原佑宜、太田美乃、柘植文治
補酵素再生サイクルを利用したバイオポリ
エステルの生合成、湘北地区懇話会講演会
(東京工業大学すずかけ台) 2015 年 7 月 24
日

宮原佑宜、太田美乃、柘植文治
PHA 生合成における補酵素再生サイクルの
導入効果、日本生物工学会大会(鹿児島)
2015 年 10 月 26 日

宮原佑宜、太田美乃、柘植文治
ポリエステル合成細菌における補酵素再生
サイクルの影響評価、エコマテリアル研究会
(東京大学) 2016 年 3 月 4 日

宮原佑宜、太田美乃、柘植文治
ポリエステル合成細菌における補酵素再生
サイクルの効果、高分子学会年次大会(神戸)
2016 年 5 月 25 日

Miyahara, Y., Ohta, M., Tsuge, T.
Enhanced effect of cofactor regeneration cycle on
polyhydroxyalkanoate biosynthesis in
Escherichia coli, The 6th International
Conference on Bio-based Polymers (ICBP2017),
Taiwan, 2017.05.15

宮原佑宜、太田美乃、柘植文治
バイオポリエステル生産における補酵素再
生系の影響評価、第 6 回 JACI/GSC シンポジ
ウム(東京) 2017 年 7 月 4 日

宮原 佑宜、太田美乃、柘植文治
亜リン酸の酸化反応による補酵素再生シス
テムを用いたバイオプラスチックの生合成、
第 6 回日本生物工学会東日本支部コロキウム
(筑波大学) 2018 年 3 月 2 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tsuge.iem.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柘植 丈治 (Tsuge, Takeharu)

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：70332260

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし