

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760632

研究課題名 (和文)

無細胞バイオポリエステル合成を可能とするモノマー供給酵素の開発

研究課題名 (英文)

Development of monomer-supplying enzymes for cell-free biopolyester production

研究代表者

佐藤 康治 (SATO YASUHARU)

北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：30360928

研究成果の概要 (和文)：

石油由来プラスチックを代替でき、再生可能なマテリアル・ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の新しい発想に基づく生産プロセス開発が望まれている。そこで糖を原料とした無細胞 PHA 合成法を考案、本研究ではその合成法に適したモノマー供給酵素 (R) 体特異的 NADH 依存型還元酵素の開発を行った。(S) 体特異的 NADH 依存型還元酵素の立体選択性の改変、(R) 体特異的 NADH 依存型還元酵素の探索により目的の活性を有する酵素を発見することができた。

研究成果の概要 (英文)：

Polyhydroxyalkanoates (PHAs), which originate from renewable resources such as sugars and vegetable oils, have attracted great interest as alternatives to petrochemical-based plastics. To construct a novel cell-free PHA production system from sugars as feedstocks, an (R)-specific and NADH-dependent reductase is needed. In this study, we successfully developed the reductases to exchange stereo-selectivity of an (S)-specific enzyme. In addition, we could find the reductase from databases.

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 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：酵素反応、環境材料、バイオテクノロジー、バイオリクター

1. 研究開始当初の背景

近年持続可能な社会の形成のため再生可能なバイオマスを原料とした物質生産技術の開発が渴望されている。ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は糖や植物油などを原料として生産でき、且つ熱可塑性および生分解性を有することから、石油由来プラスチックを代替するマテリアルとして有望視されている。その物性はモノマーユニット組成によりエラ

ストマータイプから硬度を有するプラスチック材料にまで幅広くコントロールできるため様々な分野への応用が期待されている。

2. 研究の目的

PHA 生産については微生物による発酵生産に関する研究が多数報告されている。この発酵法では用いる微生物や原料によりモノマーユニット組成や分子量をコントロールす

ることは可能であるが、微生物の代謝経路や資化性などの影響を受けるため厳密な制御は困難である。これに対し我々は微生物を用いない酵素触媒重合法の開発を行ってきた。本法では反応に用いる原料や酵素の組み合わせを変えるだけでモノマーユニット組成や分子量を精密に制御することが可能である。さらに微生物では合成困難なモノマーユニットから成る PHA の合成にも成功しており、高機能化も可能である。現在は従来の成果をさらに発展させた新規酵素触媒重合法「無細胞 PHA 合成法」の可能性について検討しているが、その実現には NADH 依存型 (R) 体立体選択的 acetoacetyl CoA reductase が必要である。

代表的な PHA 合成細菌 *Cupriavidus necator* においては PHA 合成酵素 PhaC への R 体立体選択的なモノマー供給のため、PHA 合成酵素遺伝子 *phaC* の下流に acetoacetyl CoA reductase 遺伝子 *phaB* が配置されオペロンとして発現されている (Peoples, PO and Sinskey, AJ, *J. Biol. Chem.* 1989)。この PhaB は NADPH を補酵素として (R)-3-hydroxyacyl CoA (3HBCoA) へと立体選択的に還元する。*Zoogloea ramigera* 由来 PhaB も NADPH 依存型で (R) 体立体選択性を示すことが報告されている (Saito, T ら *Arch. Microbiol.* 1977)。さらに我々がクローニングした *Bacillus* sp. INT005 由来 PHA 生合成関連遺伝子クラスター中にも *phaB* に相同性を示す遺伝子を見出し、その酵素について解析した (*J. Biosci. Bioeng.* 2002)。その結果、本酵素も NADPH 依存型であり R 体選択性を示すことが明らかとなった。このように PHA 合成に関連した PhaB は NADPH 依存型であり「無細胞 PHA 合成系」へは利用できない。そこで本研究では NADH 依存型 acetoacetyl CoA reductase の開発について検討した。

3. 研究の方法

NADH 依存型 acetoacetyl CoA reductase 開発のため、下記の 3 項目について検討した。

- (1) NADH 依存型 (S)-3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase の立体選択性の改変
- (2) Acetoacetyl CoA reductase (PhaB) の補酵素依存性の改変
- (3) NAD 依存型 (R)-3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase の探索

(1) NAD 依存型 (S)-hydroxyacyl CoA dehydrogenase の立体選択性の改変

Clostridium 属細菌は NAD 依存型 (S) 体立体特異的 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase

(Had) を有し、アセトンやブタノール合成に利用している。この Had の立体選択性を反転できれば NADH 依存型 (R) 体選択的 acetoacetyl CoA reductase が取得できると考えた。May, O. ら (*Nature Biotechnol.* 2000) や Liebeton K ら (*Chem. Biol.* 2000) はターゲット酵素へのランダム変異導入により立体選択性の反転に成功している。そこで本研究においても同様の手法を用いることにした。

(2) Acetoacetyl CoA reductase (PhaB) の補酵素依存性の改変

Aldehyde dehydrogenase において、NAD(P)H 結合ドメインである Rossmann fold 下流の Glu 140 のカルボキシル基が NAD のアデニンリボースの水酸基と水素結合し、一方 NADP のアデニンリボースのリン酸基とは反発することで補酵素特異性を決定していると報告されている (Perozich, J. ら, *Eur. J. Biochem.* 2000、図 1)。

PhaB と同様の反応を触媒する酵素として (R)-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase (Hbdh) がある。これは NAD 依存的に (R)-3-Hydroxybutyrate → Acetoacetate の反応を触媒する (Ito, K. ら *J. Mol. Biol.* 2006)。PhaB および Hbdh のアミノ酸配列を比較したところ高い相同性が認められた (図 1)。特に N 末端側には NAD(P)H 結合ドメインである Rossmann Fold が認められた。この下流には NADP 依存型酵素である PhaB では Asn、NAD 依存型酵素である Hbdh では Asp が保存されている部位が見いだされた。先に示した Aldehyde dehydrogenase と同様の機構により補酵素認識が行われているのであれば、このアミノ酸配列の違いが補酵素選択性を決定していると考えられる。そこでこのアミノ酸に対して部位特異的変異を導入し、その効果を評価した。

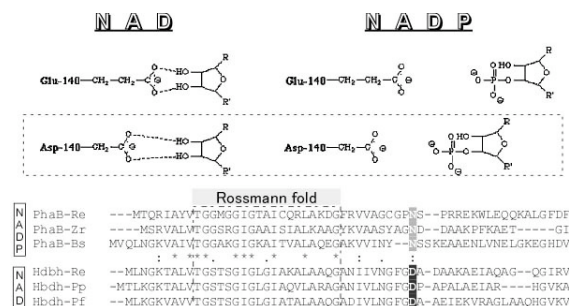


図 1 補酵素認識メカニズムおよび PhaB と Hbdh のアミノ酸配列の比較

(3)NAD 依存型 (R)-3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase の探索

PhaB はその高い立体選択性を生かし ethyl 4-chloroacetoacetate からの ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrate ((S)-ECHB) 合成への応用が報告されている (Yamamoto, H. ら *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003)。そこで NADH 依存型 (S)-ECHB 合成酵素として報告されているもののなかには有用な酵素があると考え探索した。

4. 研究成果

(1)NAD 依存型 (S)-3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase の立体選択性の改変

はじめに変異酵素のスクリーニング法について検討した。菌体内に蓄積された PHA は Nile Red により染色されることが知られており、寒天プレートへ添加することで PHA 合成を評価した。*C. necator* において PHA 合成酵素遺伝子 *phaC* の下流に、thiolase 遺伝子 *phaA* および acetoacetyl CoA reductase 遺伝子 *phaB* が配置され一つのオペロンを形成し、それらが acetyl CoA (AcCoA) からの (R)-3HBCoA 供給に関与している (図 2)。これら 3 つの遺伝子を大腸菌へ組み込んだところ、Nile Red 含有寒天プレートにて PHA 合成を確認することが出来た。そこで *phaB* を Had 遺伝子へと置換したところ PHA 合成を確認することができなかつた。この結果より、変異酵素のスクリーニングに有効であると判断した。

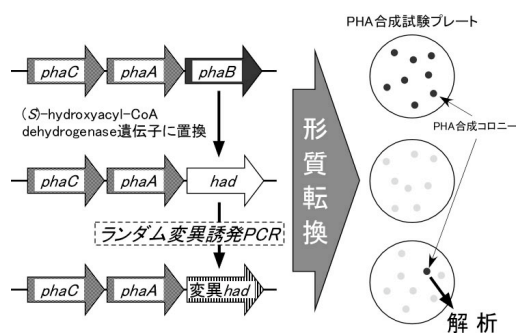


図 2. 立体選択性改変酵素のスクリーニング戦略

次に Had 立体選択性の改変について検討した。Had 遺伝子へのランダム変異導入には GeneMorphII ランダム変異導入キット (ストラタジーン社) を使用した。処理された Had 遺伝子を *phaCA* 遺伝子の下流へ挿入し、大腸菌へ組み込み、寒天プレートにて PHA 合成能を評価した。この結果、PHA 合成を示すコロニー (約 10 個) を獲得することに成功した。

現在はその変異部位の同定およびその効果について解析を進めている。

(2)Acetoacetyl CoA reductase (PhaB) の補酵素依存性の改変

PhaB の Asn38Asp 変異体を作製し大腸菌粗酵素液を用いて評価した。変異体酵素の発現を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認したところ、コントロールと比較したが明白に発現量の異なるバンドを見いだすことはできなかつた。また粗酵素液を用い活性試験を行った。その結果、内在する NADH 分解活性により変異の効果をも正しく評価できなかつた。よって Asn38Asp 変異体の高発現条件の検討および酵素精製が必要であるといえる。

(3)NAD 依存型 (R)-3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase の探索

NADH 依存型 (S)-ECHB 合成酵素として *Geobacillus stearothermophilus* 由来 *fabG* ホモログが報告されていた (特開 2002-209592)。そこで本遺伝子入手し、図 1 のストラテジーに従い *phaCA* 遺伝子の下流へ挿入した。そして大腸菌へ組み込み寒天プレートにて PHA 合成能を評価した結果、PHA 合成が確認された。先に示した (2) の結果を踏まえ、本酵素を精製して補酵素特異性を評価した。大腸菌にて高発現させ精製した酵素、acetoacetyl CoA および NAD(P)H を用い活性試験を行った。その結果 NADH を補酵素とした場合に高い活性を示すことがわかつた。

本研究では「無細胞 PHA 合成法」へ利用可能な NADH 依存型 acetoacetyl CoA reductase の開発について検討した。その結果、所望の活性を有する候補を取得することに成功した。今後はそれらを活用し「無細胞 PHA 合成法」の開発を進める。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Xuerong Han, Yasuharu Satoh, Toshifumi Satoh, Ken' ichiro Matsumoto, Toyoji Kakuchi, Seiichi Taguchi, Tohru Dairi*, Masanobu Munekata, and Kenji Tajima, Chemo-enzymatic synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) incorporating 2-hydroxybutyrate by wild-type Class I PHA synthase from *Ralstonia eutropha*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有, (in press)
- ② Xuerong Han, Yasuharu Satoh, Kenji Tajima, Tokuo Matsushima, and Masanobu

Munekata, Chemo-enzymatic synthesis of polyhydroxyalkanoate by an improved two-phase reaction system (TPRS), Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, 108, 2009, 517-523

- ③ 佐藤康治, 田島健次, 松島得雄, 大嶋武, 棟方正信, 微生物を活用したバイオポリマーへの物質変換, 環境技術, 査読無, 38, 2009, 14-18

[学会発表] (計4件)

- ① 佐藤康治, 松谷枝里子, 韓雪容, 中本翔, 田島健次, 松島得雄, 棟方正信, 耐熱性 PHA 合成細菌由来 PHA 合成酵素遺伝子のクローニングとその解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 26-28 日, 京都
- ② 韓雪容, 佐藤康治, 田島健次, 鳥谷部哲也, 松島得雄, 大利徹, 棟方正信, 改良水-有機溶媒二相反応系による新規ポリヒドロキシアルカン酸の合成, 高分子学会 第 59 回高分子討論会, 2010 年 9 月 15-17 日, 札幌
- ③ 岩本浩介, 谷尾亮, 佐藤康治, 田島健次, 堺井亮介, 佐藤敏文, 鳥谷部哲也, 松島得雄, 覚知豊治, 大利徹, 棟方正信, 官能基修飾によるポリヒドロキシアルカン酸の高機能化, 高分子学会 第 59 回高分子討論会, 2010 年 9 月 15-17 日, 札幌
- ④ 佐藤康治, One-pot ポリヒドロキシアルカン酸合成法の開発, バイオポリマー研究の最前線-バイオと化学のクロストーカー-, 2009 年 6 月 29 日, 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 康治 (SATO YASU HARU)
北海道大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号: 30360928

(2) 研究協力者

田島 健次 (TAJIMA KENJI)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 00271643

韓 雪容 (HAN XUERONG)
北海道大学・大学院工学研究院・博士後期課程
研究者番号: なし