

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780066

研究課題名（和文）

C<sub>1</sub>化合物を原料にした共重合バイオポリエステル生合成のための微生物分子育種

研究課題名（英文）

Genetic engineering for production of copolymerized biopolyester from C<sub>1</sub> compounds

研究代表者

折田 和泉（ORITA IZUMI）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：70525964

研究成果の概要（和文）：

メタノールを単一炭素源にして高物性共重合ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を効率的に生合成する株の取得を目的として、代表的なメチロトロフである *Methylobacterium extorquens* AM1 株の代謝改変を行った。その結果、野生株が合成するPHAは炭素数5のモノマーも共重合した共重合PHAであるという重要な事実を明らかにするとともに、メタノールを単一炭素源として炭素数4,5,6の3つのモノマーが共重合した珍しいPHAを効率よく蓄積する組換え株の取得に成功した。

研究成果の概要（英文）：

This study is aimed at construction of recombinant methylotrophic bacteria to produce flexible polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymers from methanol using *Methylobacterium extorquens* AM1 as a host strain. The results revealed that *M. extorquens* wild-type strain accumulates PHA copolymer composed of mostly C<sub>4</sub> monomer with a small amount of C<sub>5</sub> unit. The recombinant strains, which can accumulate PHA composed of C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, and C<sub>6</sub> unit, was successfully obtained. These strains produced PHA more efficiently than wild-type strain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ポリヒドロキシアルカン酸、C<sub>1</sub>化合物、メタノール資化性細菌

## 1. 研究開始当初の背景

（1）ポリヒドロキシアルカン酸とメタノール資化性菌

ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、微生物がエネルギー貯蔵物質として体内に蓄積する生体高分子であり、バイオマス資源など石油以外の原料から生産出来る生分解性プラスチック

ックとして実用化が期待されている。一方、本研究でPHAの生産原料として着目したメタノールは、主として石油に比べて貯蔵量が多い天然ガスから生成されるばかりでなく、バイオマスやメタンハイドレートからも得られることから持続供給が可能かつ安価な炭素源であり、また、食料と競合しない、持ち運び

が容易という利点も有する。このようなメタノールを炭素源・エネルギー源として生育出来る微生物(メチロトローフ)は、メタノールを原料とした発酵生産の宿主として有用である。

(2) メチロトローフによるPHA生産  
メチロトローフのなかには、*Paracoccus denitrificans*や*Methylobacterium extorquens*などPHAを合成する菌が存在する。特に、*P. denitrificans*によるバイオポリエステル生産は企業化に向けた製造試験も行われていたが、これらのメチロトローフは、メタノールを単一炭素源にして培養した際には、 $C_4$ ユニットのみからなるホモポリマーポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸)[P(3HB)]のみを合成することが報告されている。P(3HB)は環境中の多くの微生物がつくる代表的なPHAであるが、脆くて柔軟性に乏しい材料であるため実用化は困難である。一方で、PHAの物性を向上させる方法として、培地中の炭素源を工夫することによって第二モノマー成分を導入する共重合化があげられる。例えば、メチロトローフに、メタノールと*n*-ペンタノールの混合炭素源を加えると共重合体であるポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシペンタン酸)[P(3HB-*co*-3HV)]を合成できるが、*n*-ペンタノール添加による高コスト化と、この共重合体では柔軟性がまだ十分ではないことが課題となっていた。

(3) *M. extorquens*の代謝改変  
*M. extorquens* AM1株が染色体上に有しているPHA重合酵素遺伝子を広基質特異性PHA重合酵素をコードする*Aeromonas caviae*由来遺伝子に相同性組換えによって置換した株(AM1Cac)を取得し、この組換え株がメタノールを唯一の炭素源として、0.2 mol%の炭素数6のユニットを含む共重合体を合成することを見出していた(福居 折田 特願2008-053793)。この結果から、本菌がアセチル-CoAを前駆体として $C_6$ モノマーである(*R*)-3-ヒドロキシヘキサノイル-CoAを供給可能な酵素を有しているものの、その活性が十分でないことが推測されていた。

## 2. 研究の目的

PHAは微生物の代謝を制御することで、種々のモノマー組成を変化出来ることが大きな利点の一つである。そこで本研究では、メチロトローフを宿主として、遺伝子発現や破壊といった遺伝子工学的代謝改変を行うことで、従来の微生物ポリエステルよりもしなやかで柔軟な性質を有するポリマーを石油の代替資源として有用かつ安価な $C_1$ 化合物を単一炭素源として効率的に合成する微生物

の育種を目的とした。本研究では特に、 $C_6$ ユニットが共重合した共重合PHAに着目した代謝改変を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 菌体の培養

微生物育種の宿主として、*Methylobacterium extorquens* AM1を用いた。菌体の培養は、窒素源制限無機塩培地を用い、前培養時には20 mMのコハク酸を本培養時には基本的に0.5%メタノールを炭素源として加え、30℃で振とう培養を行った。

### (2) 遺伝子操作

相同組換え用のベクターとしてpK18mobsacBを用いた。相同組換え法として、単交差相同組換えを用い、カナマイシン耐性を指標としてpop-in株を取得し、pop-out株取得の際にはスクロス存在下におけるネガティブ選択を行った。遺伝子発現用のベクターには、*M. extorquens* AM1株のメタノールデヒドロゲナーゼプロモーターを配したpBBRmxAFおよびpCM80(Km)を用いた。

### (3) PHA分析

PHA分析には、培養後、凍結乾燥した菌体を用いた。これをメタノリシスした後、ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフ質量分析計に供した。

## 4. 研究成果

### (1) *M. extorquens* AM1野生株およびAM1Cac株が合成するPHAの再解析

野生株や組換え株の凍結乾燥菌体をガスクロマトグラフィーやガスクロマトグラフ質量分析計に供することで、野生株が合成するPHAは炭素数5のモノマーも共重合した共重合PHAであるという重要な事実を明らかにした。AM1Cac株は、炭素数4,5,6の3つのモノマーが共重合した共重合PHA、ポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシペンタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサノ酸)[P(3HB-*co*-3HV-*co*-3HHx)]を蓄積していた。

### (2) PHA分解酵素遺伝子の破壊

PHA蓄積率の向上を目的として、PHA分解酵素遺伝子の破壊を行った。PHA分解酵素遺伝子では、*depA*、*depB*の二つが同定されているが、相同性検索の結果、さらにもう一つの遺伝子(*depC*と命名した)も分解酵素をコードしていることが予想された。そこで、これら3つの遺伝子の単独破壊株、二重破壊株、三重破壊株を相同組換えによって構築した(図1)。これらをメタノールを単一炭素源として培養した結果、予想に反していずれの破壊株で

もPHA蓄積、生育能ともに宿主株と優位な差はみられず、用いた培養条件ではPHAの分解が起こっていないことが示唆された。メタノール濃度など培養条件を変えたときの影響を現在検討中である。

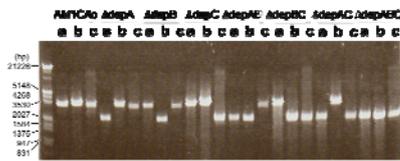


図1 .PCRによるPHA分解酵素遺伝子破壊株取得の確認

(それぞれの遺伝子の上下流領域に結合するプライマーを用いた。a, depA; b, depB; c, depC)

(3) 遺伝子発現によるモノマー供給の強化  
 本菌はグリオキシル酸の再生のためにエチルマロニル-CoA経路 (EMCP) を有する。EMCP上には、第二モノマーの前駆体となるCoA中間体が存在するため、これらのCoA中間体を第二モノマー成分に導くための遺伝子をAM1Cac株内で高発現した(図2)。その結果、広基質特異性を有することが知られている *Ralstonia eutropha* 由来  $\beta$ -ケトチオラーゼや *Pseudomonas* sp 61-3由来3-ケトアシル-ACPレダクターゼをコードする遺伝子を発現したときにC<sub>5</sub>ユニット分率がAM1Cac株の10倍程度増加していた。また、クロトニル-CoAカルボキシラーゼ/レダクターゼ遺伝子を発現させたとき、C<sub>6</sub>ユニットの分率がAM1Cac株の2倍程度増加した。しかし、この発現株でもC<sub>6</sub>ユニット分率は0.5 mol%と低かった。この原因の一つとして、クロトニル-CoAカルボキシラーゼ/レダクターゼの触媒反応がカルボキシラーゼ反応に偏っていることでC<sub>6</sub>ユニットの前駆体となるブチリル-CoA供給量が少ないことが考えられた。現在、本酵素の進化工学的改変を行い、レダクターゼ反応に適した酵素の取得を目指している。また、本菌のPHAモノマー合成酵素である  $\beta$ -ケトチオラーゼおよびアセトアセチル-CoAレダクターゼをコードする *phaA*, *phaB*を高発現した結果、PHA蓄積率のみならずC<sub>5</sub>ユニット分率の増加も確認され、これらの酵素が広基質特異性を有することが明らかとなった。これらの遺伝子組換えの結果、最大で45 wt%の共重合PHAの蓄積を認め、これは野生株(約7 wt%)の約6.5倍であった。メタノールを原料にして、PHA蓄積効率の向上に成功した例は本研究以外に例を見ない。

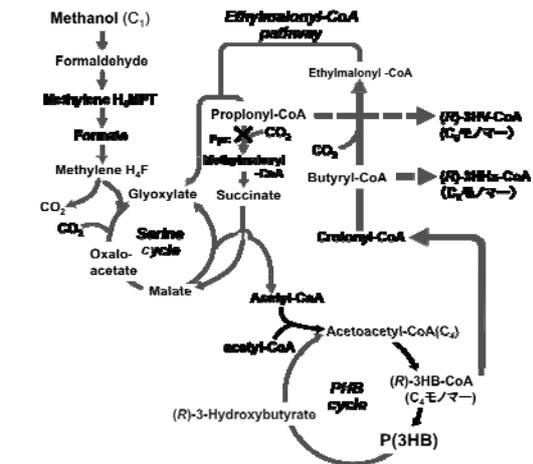


図2 .*M. extorquens*のメタノール代謝経路と本研究で用いた代謝改変戦略

(太線は高発現した遺伝子が触媒する反応を示す。)

(4) EMCP上の酵素遺伝子破壊による第二モノマー供給の強化

EMCP上のプロピルニル-CoAカルボキシラーゼ遺伝子 (*ppc*) を相同組換えにより破壊した(図2)。破壊株はメタノール生育能を失ったが、コハク酸を炭素源とした培地で生育させてからメタノールを加えた培地に植継ぐ二段培養を行ったところ、C<sub>5</sub>ユニット分率がAM1Cac株に比べて大幅に増加していた。また、この株のメタノール生育能の回復のために、本菌が有するC<sub>1</sub>化合物資化経路(セリン経路)とは異なる資化経路(リブロースモノリン酸経路)の鍵酵素である3-ヘキシロース6-リン酸シンターゼと6-ホスホ-3-ヘキシロイソメラーゼの遺伝子やリブロース1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシダーゼを導入したが、いずれの株もメタノール生育能は相補しなかった。

## 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)

〔学会発表〕(計5件)

(1) 折田和泉、遺伝子組換えメチロトロフによるアルコールからのポリヒドロキシアルカン酸合成、日本農芸化学会、2012.3.23、京都女子大学

(2) 折田和泉、メタノールを原料とした共重合ポリヒドロキシアルカン酸生合成のための代謝改変、日本生物工学会、2011.9.27、東京農工大学 小金井キャンパス

(3) 折田和泉、遺伝子組換え *Methylobacterium extorquens* によるメタノールからの共重合ポリヒドロキシアルカン酸生合成、日本農芸化学会、2011.3.25-28、京都女子大学

(4) 折田和泉、Engineering the *Methylobacterium extorquens* for biosynthesis of poly((R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate)、ゴードンリサーチカンファレンス、2010.8.1-6、Bates College メイン州 ルイストン

(5) 折田和泉、C1 化合物を単一炭素源にした共重合体 PHA の生合成、バイオポリマーシンポジウム、2009.6.29、北海道大学 百年記念館

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

折田 和泉 (Orita Izumi)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：70525964