

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03640

研究課題名(和文)人工代謝系構築による微生物ポリエステルの生合成法開発と材料物性評価

研究課題名(英文) Biosynthesis of  $\alpha$ -methylated polyhydroxyalkanoates by constructing artificial pathway and characterization of their thermal properties

研究代表者

柘植 丈治 (Tsuge, Takeharu)

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号：70332260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が合成するポリヒドロキシアルカン酸(PHA)のうち、 $\alpha$ 位がメチル化されたPHAの生合成法の開発に取り組んだ。具体的には、大腸菌を宿主として線虫由来の新規なケトチオラーゼAcat3を発現させることによって、アセチルCoAとプロピオニルCoAのクライゼン縮合により前駆体を合成し、これをレダクターゼPhaBによって還元することで、PHA重合酵素PhaCの基質とした。その結果、 $\alpha$ -メチル化モノマーを約16 mol%までPHA共重合体中に取り込ませることに成功した。これらのポリマーの熱物性を解析し、既存のPHAとの結晶化挙動の比較を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物ポリエステルは、バイオマスを原料とすることによる持続可能性と優れた自然環境中での生分解性から、今後、広く普及が期待されるプラスチックのひとつである。一方で次世代の微生物ポリエステルには、実用的な材料物性を担保しつつ、かつ、結晶化挙動に優れることが求められる。今回合成法を開発した $\alpha$ -メチル化PHAは、炭素のメチル化によって結晶化が迅速に進むようになり、この材料の有用性を示すことができた。これらの成果は、高性能な材料の分子設計を行う上で重要な知見として役立てることができる。

研究成果の概要(英文)：Biosynthesis of  $\alpha$ -methylated polyhydroxyalkanoates (PHAs) was investigated by constructing an artificial pathway in *Escherichia coli*. By employing a novel ketothiolase Acat3 derived from nematodes, a precursor was synthesized by Claisen condensation of acetyl-CoA and propionyl-CoA, which was then reduced by reductase PhaB to serve as a substrate for the PHA synthase PhaC. As a result, it succeeded in incorporating  $\alpha$ -methylated monomers up to approximately 16 mol% into PHA copolymers. The thermal properties of these polymers were characterized, and their crystallization behavior was compared with that of conventional PHAs.

研究分野：生体高分子

キーワード：生分解性プラスチック バイオプラスチック ポリヒドロキシアルカン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一部の微生物は、脂肪族バイオポリエステル(PHA)を合成し、その細胞内に蓄積する。PHAは、微生物の炭素およびエネルギー貯蔵物質としての生理的な役割を果たし、飢餓時において分解され、エネルギー源に利用される。そしてPHAは、熱可塑性を示す天然高分子であるため、環境中においても優れた生分解性を示す。近年は、バイオマスを原料として生産されたPHAを環境調和型プラスチックとして利用することに注目が集まっている。

これまでに、種々の微生物においてPHAの蓄積が報告されており、それを構成するモノマーユニットは200を超える種類が発見されている。PHAにおいて最も一般的なモノマーユニットは(R)-3-ヒドロキシブタン酸(3HB)であり(図1)、このホモポリマーであるP(3HB)は、融点( $T_m$ )=175、ガラス転移点( $T_g$ )=4を示す。一方でP(3HB)は、硬くて脆いという性質のため、単独で材料として利用するには困難が伴う。この欠点を克服するために、P(3HB)を出発点として物性を改変するために、3HBを主成分とする種々の共重合体の開発が進められてきた。

これまでに開発された3HB共重合体は、3HBよりも側鎖炭素数が1つ多い3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)との共重合体P(3HB-co-3HV)や、3HBよりも側鎖炭素数が2つ多い3-ヒドロキシヘキサ酸(3HHx)との共重合体P(3HB-co-3HHx)である。しかしながら、3HVユニットは3HBと構造が似ているため共結晶を形成し、大幅な物性の改善には至らなかった。また、3HHxユニットの導入により材料の脆性は改善できたものの、結晶化速度が低下する結果となった。従って、次世代バイオポリエステルには、材料の柔軟性を担保しつつ、かつ、結晶化挙動に優れることが求められる。

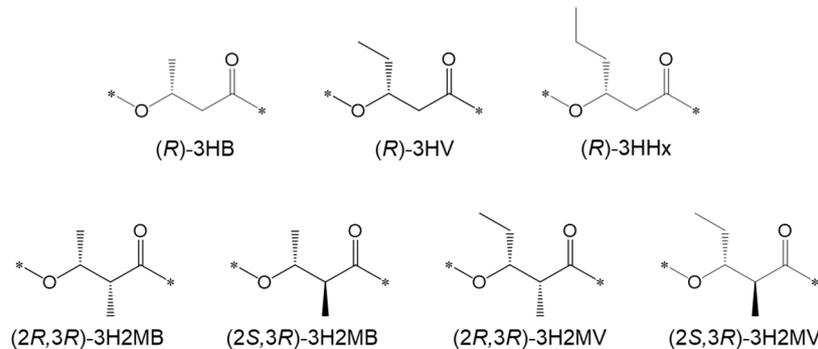


図1 PHAのモノマー構造

(上段は一般的なモノマー、下段は 2位がメチル化されたモノマー)

### 2. 研究の目的

申請者は、微生物が合成するPHAのうち、3-ヒドロキシ-2-メチルブタン酸(3H2MB)モノマーからなる共重合体および単独重合体について世界で初めて生合成に成功し、その基礎物性の解析に取り組んできた。<sup>1</sup> これまでに、3H2MB共重合体はP(3HB)よりも柔軟性があり、かつ、易結晶化を示す高性能ポリマーであることを見出した。<sup>1</sup> この発見は、結晶化速度が遅く加工性に難点があった現行バイオポリエステルの欠点を改善するものと期待できる。そこで本課題では、高性能ポリマーとして 2位がメチル化されたPHAに着目し、研究開始当時に僅かな量しか合成できないこのポリマーを、高収量で生産する方法を確立するために、2位メチル化モノマーを供給する人工代謝系の構築と 2位メチル化モノマーに対して高い重合活性を示す重合酵素の探索を行った。

### 3. 研究の方法

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

3-1. 前駆体を利用しない メチル化モノマー合成法の開発

研究開始当初は、3H2MB 前駆体としてチグリン酸を利用して P(3HB-co-3H2MB)および P(3H2MB)の合成を行っていた。チグリン酸は菌体増殖に対して阻害作用があるため、二段培養法を採用することで、少量ながらポリマーを合成することが可能であった。そこで、生産量を大幅に上げるために、菌体内で メチル化モノマーを合成する代謝経路の構築について検討を行った。具体的には、大腸菌を宿主として線虫 *Ascaris suum* 由来の新規なチオラーゼ Acat3<sup>2</sup> を発現させることによって、アセチル CoA とプロピオニル CoA のクライゼン縮合により 3-オキソ-2-メチルブチリル-CoA を合成し、これをレダクターゼ PhaB によって還元することで、PHA 重合酵素 PhaC の基質となる 3H2MB-CoA を合成することを検討した(図2)。また、R-特異的エノイル CoA ヒドラーゼ PhaJ の追加発現についてもその効果について検証した。一方で、現時点では大腸菌の細胞内で十分な量のプロピオニル CoA を合成することが難しいため、主炭素源であるグルコースの他にプロピオン酸を培地に添加した。

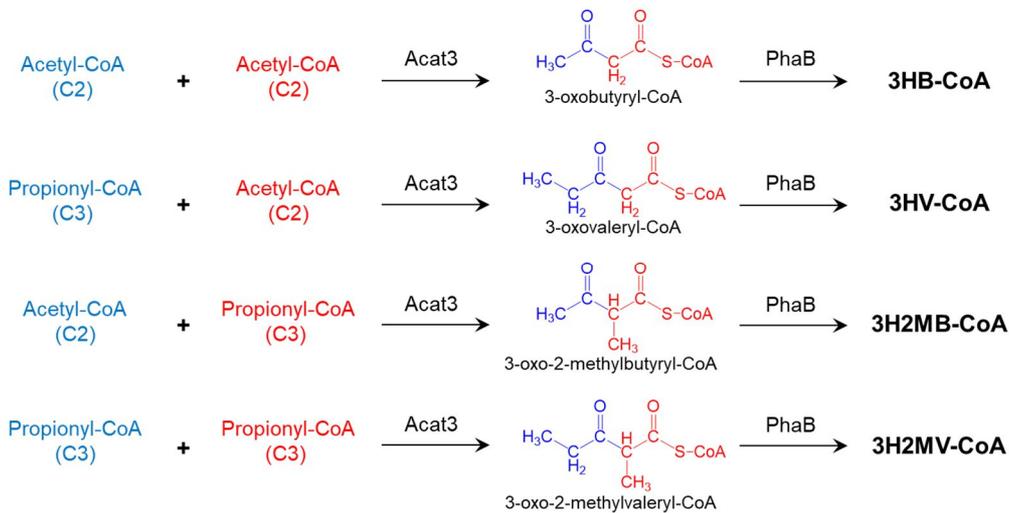


図2 新規チオラーゼ Acat3 を使用したモノマーの供給経路とそのバリエーション

生合成した メチル化ポリマーは、乾燥菌体からクロロホルムを用いて抽出し、再沈殿を繰り返して精製を行った。その後、核磁気共鳴(NMR)法による構造確認、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)を用いた光学異性体の解析に供した。

3-2. 高 3H2MB 重合活性を示す重合酵素の探索

3H2MB を効率的に重合できる重合酵素を取得するために、3H2MB に対する重合活性が確認されている *Aeromonas caviae* 由来重合酵素(PhaC<sub>Ac</sub>)のアミノ酸配列情報を基に、ライブラリー検索を行うことで類似配列の探索を行った。候補配列については、該当遺伝子を化学的に人工合成し、大腸菌での発現系を構築した。3H2MB の前駆体としてチグリン酸を培地に添加して大腸菌を培養し、ポリマーの合成量および共重合組成の評価を行った。また、過去の研究で明らかになっている重合酵素の活性化に効果がある変異点についても部位特異的に導入し、変異導入の効果について検証した。

3-3. メチル化ポリマーの結晶化挙動の解析

生合成した メチル化ポリマーは、乾燥菌体からクロロホルムを用いて抽出し、沈殿により精製後、示差走査熱量計(DSC)を用いた測定に供した。十分に室温で結晶化させた溶媒キャストフィルムを測定に使用し、第一昇温から  $T_m$  と融解エンタルピー(  $H_m$  )を、その後急冷し、第二昇温から  $T_g$  および冷結晶化温度(  $T_{cc}$  )を決定した。また、融点以上の温度から定速降温することにより結晶化温度(  $T_c$  )を、等温結晶化により半結晶化時間(  $T_{1/2}$  )を測定した。

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

4. 研究成果

4-1. 前駆体を利用しない メチル化モノマー合成法の開発

新規チオラーゼ Acat3 の発現系を構築し、PhaC<sub>Ac</sub> の N149S/D171G 変異体(NSDG 変異体)<sup>3</sup> を発現させた大腸菌内でポリマー合成に供した。プロピオン酸を添加しない培養では、大腸菌は P(3HB)のみを合成し、メチル化モノマーは検出されなかった。一方で、プロピオン酸ナトリウムを 9 g/L の濃度で培地に添加すると、合成されたポリマーの中に 3-ヒドロキシ-2-メチルバレリン酸(3H2MV)が 2.4 mol%取り込まれていた。3H2MV は 3H2MB より 位の側鎖が炭素 1 個分長いモノマーであり、メチル化モノマーの一種である。一方で 3H2MB の取り込みは非常に微量(0.1 mol%以下)であった。また、プロピオン酸による生育阻害が強く見られ、プロピオン酸濃度が高くなるにつれて、菌体収量およびポリマー合成量は低下した。次に、PhaJ を追加発現させて、同様の培養実験を行った。その結果、3H2MV が最大で 6.7 mol%まで上昇し、3H2MB についても 0.4 mol%ほど取り込まれていることが確認された。このことから、PhaJ の発現はメチル化モノマーの供給を強化する効果があることがわかった。

次に、生合成された 3H2MV ユニットの 位炭素のキラリティーについて解析を行った。キラルカラムを装着した GC-MS を用いた解析の結果、PhaJ 非発現株で合成した 3H2MV ユニットの (2R,3R)体:(2S,3R)体の存在比が 4:6 であったが、PhaJ 発現株では(2R,3R)体:(2S,3R)体の存在比が 8:2 となっていた(図3)。PhaJ 発現株では 3H2MV 分率が上昇するが、これは主に PhaJ が(2R,3R)体の 3H2MV を供給するためと考えられる。

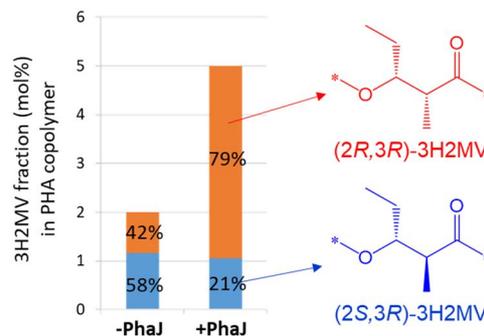


図3 Acat3 発現株における PhaJ の追加発現効果

4-2. 高 3H2MB 重合活性を示す重合酵素の探索

PhaC<sub>Ac</sub> の類似酵素を探索するために、データベースを用いた相同性検索を行った。多くの相同配列がヒットしたが、その中から相同性が 85~90%程度でこれまでに研究報告の無い *Ferrimonas marina*, *Plesiomonas shigelloides*, *Shewanella pealeana*, *Vibrio metschnikovii* 由来の配列を選択し、これらが大腸菌のコドン使用頻度で最適化した遺伝子として人工合成した。これら phaC 遺伝子を用いて、まず P(3HB)の生合成を行うと、4 種類全ての phaC 遺伝子が機能し、P(3HB)を合成することを確認した。そして、チグリリン酸を前駆体として 3H2MB を含む共重合体の生合成を行うと、*S. pealeana* 由来の phaC 遺伝子で最も高い 3H2MB 分率である 2.1 mol%を示した。さらに、これまでの研究で明らかになっている重合酵素の活性化に効果がある N175G 変異(NG 変異)についても *S. pealeana* 由来 phaC 遺伝子に導入し、その変異導入の効果について検証した。その結果、3H2MB 分率は 5.4 mol%まで上昇し、同一培養条件における PhaC<sub>Ac</sub> NSDG 変異体(4.9 mol%)よりも高い 3H2MB 分率を示した。これにより、3H2MB に対して高い重合活性を有する重合酵素およびその変異体の取得に成功した。

4-3. メチル化ポリマーの結晶化挙動の解析

当初予定していた 3H2MB を含むポリマーよりも 位の側鎖が 1 つ長い 3H2MV の方が効率的に合

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

成ることができたので、3H2MB を含むポリマーの熱的物性について調べることにした。まず、*trans*-2-メチル-2-ペンテン酸を3H2MV 前駆体として P(3HB-*co*-11 mol% 3H2MV) [PHBM11]を合成して、DSC を用いた熱分析に供した。ちなみにこのポリマーにおける 3H2MV は全て(2*R*,3*R*)体であることを確認している。PHBM11 の  $T_m$  は 162 に見られ、非メチル化共重合体 P(3HB-*co*-12 mol% 3HV) [PHBV12]の  $T_m$  である 139 よりも高い値であることが示された。また  $T_c$  は 72 と非メチル化共重合体(54 )よりも高い値であったことから、易結晶化の兆候が見られた。そこで等温結晶化による  $T_{1/2}$  の測定を行い、結晶化速度の比較を行った(図4)。PHBM11 は 75 において  $T_{1/2}$  が 1.56 min であり、P(3HB)に匹敵する値であった。これに対して、非メチル化共重合体 PHBV12 では明確な結晶化ピークを確認することができなかった。文献によれば、PHBV12 の 80 における  $T_{1/2}$  は 39.05 min と報告されている。<sup>4</sup>

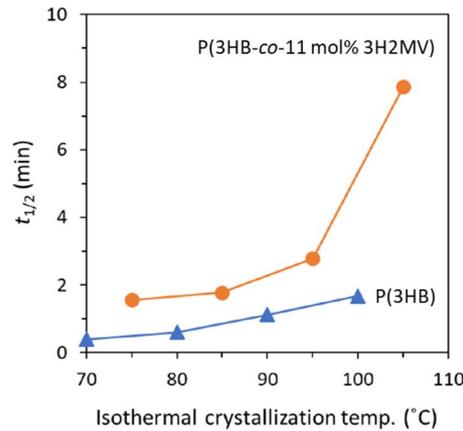


図4 等温結晶化における半結晶化時間 ( $T_{1/2}$ ) の比較

このように メチル化によって結晶化挙動に大きな違いが観察され、この材料の有用性を示すことができた。これらの成果は、高性能な材料の分子設計を行う上で重要な知見として役立てることができらるだろう。

文献

1. Furutate, S., Kamoi, J., Nomura, C.T., Taguchi, S., Abe, H., & Tsuge, T. (2021). Superior thermal stability and fast crystallization behavior of a novel, biodegradable  $\alpha$ -methylated bacterial polyester. *NPG Asia Mater.*, 13(1), 31.
2. Dong, H., Liffland, S., Hillmyer, M.A., & Chang, M.C. (2019). Engineering in vivo production of  $\alpha$ -branched polyesters. *J. Am. Chem. Soc.*, 141(42), 16877-16883.
3. Tsuge, T., Watanabe, S., Shimada, D., Abe, H., Doi, Y., & Taguchi, S. (2007). Combination of N149S and D171G mutations in *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate synthase and impact on polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 277(2), 217-222.
4. Gunaratne, L.M.W.K., & Shanks, R.A. (2005). Multiple melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) using step-scan DSC. *Eur. Polym. J.*, 41(12), 2980-2988.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sivashankari Ramamoorthi M, Mierzati Maierwufu, Miyahara Yuki, Mizuno Shoji, Nomura Christopher T., Taguchi Seiichi, Abe Hideki, Tsuge Takeharu	4. 巻 11
2. 論文標題 Exploring Class I polyhydroxyalkanoate synthases with broad substrate specificity for polymerization of structurally diverse monomer units	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1114946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2023.1114946	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Furutate Sho, Abe Hideki, Tsuge Takeharu	4. 巻 53
2. 論文標題 Thermal properties of poly(3-hydroxy-2-methylbutyrate-co-3-hydroxybutyrate) copolymers with narrow comonomer-unit compositional distributions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 1451 ~ 1457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41428-021-00545-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyahara Yuki, Nakamura Tomoya, Mierzati Maierwufu, Qie Zihan, Shibasaka Tomoki, Nomura Christopher T., Taguchi Seiichi, Abe Hideki, Tsuge Takeharu	4. 巻 11
2. 論文標題 Thermal and Crystallization Properties of a Polyhydroxyalkanoate Binary Copolymer Containing 3-Hydroxybutyrate and 3-Hydroxy-2-Methylvalerate Units	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Processes	6. 最初と最後の頁 1901 ~ 1901
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pr11071901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 柘植丈治	4. 巻 58
2. 論文標題 新しいタイプの微生物ポリマー合成とその材料物性	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 塗装工学	6. 最初と最後の頁 178-184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Miyahara, Marii Ishino, Christopher T. Nomura, Seiichi Taguchi, Hideki Abe, Takeharu Tsuge	4. 巻 -
2. 論文標題 Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers consisting of -methylated monomer units from glucose and propionate: thermal properties and chiral configuration	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biotechnol. Sustainable Mater.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s44316-024-00008-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 R. Sivashankari, Y. Miyahara, Mizuno, T. Tsuge
2. 発表標題 Identification of Novel PHA Synthases (PhaCs) with Broad Substrate Specificities
3. 学会等名 The 5th International Union of Materials Research Societies International Conference of Young Researchers on Advanced Materials (国際学会)
4. 発表年 2022年~2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 斎藤拓(監修)	4. 発行年 2024年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 254
3. 書名 高分子の結晶化, 延伸による高性能化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------