

## 様式 C-19

### 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5月24日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651032

研究課題名（和文）高度にキラル制御された乳酸ポリマー創製を目指した生体触媒開発

研究課題名（英文）Creation of biocatalyst capable of biosynthesizing lactate-based polymers with highly regulated chirality

研究代表者

田口 精一（TAGUCHI SEIICHI）

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70216828

研究成果の概要（和文）：再生可能バイオマス原料から高性能バイオポリマーを微生物生産させるシステム（微生物工場）の開発を行った。最も大きなブレイクスルーは、「乳酸重合酵素 = LPE」の発見である。今回、ポリマー合成において、R体の乳酸モノマーからS体の乳酸モノマーへ変換するために、関与する2つの酵素（CoA転移酵素と重合酵素）の分子改変に着目した。前準備として、S体乳酸が合成可能である組換え大腸菌をS体選択的LDHを遺伝子導入することで分子育種した。また、代謝と酵素の複合改変を試みたところ、ポリマー中の乳酸分率が6%から47%に上昇した。さらに、合成ポリマーの基礎物性を調べ、従来のポリ乳酸（PLA）と微生物ポリマー-PHB（ポリヒドロキシブタン酸）との比較において、ユニーク性を見出した。2種酵素のS体モノマーに対する選択性付与の進化工学実験が本格的に実施できるステージまで整備できた。

研究成果の概要（英文）：Currently microbial production system for lactate (LA) polymers with high performances has been developed. A break-through of this system was a discovery of "LA-Polymerizing Enzyme (LPE)". LPE was created through the study on the engineering of microbial polymer PHA synthase. LA-based polymer was synthesized by highly enantiomeric monomers including R-LA in an one-pot manner in *Escherichia coli* by introduction of the LPE gene from glucose. I tried to establish the system for synthesis of the polymer incorporating S-LA monomer based on the evolutionary engineering of CoA-transferase and LPE. As a result, LA fraction in the polymer has been enriched up to 47% from 6% by combination of metabolic and enzyme engineering. Furthermore, LA-based polymers exhibited distinguishable properties from the counterpart homopolymers, PLA and PHB.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：生分解性プラスチック、進化工学、ポリヒドロキシアルカン酸、キラリティー、光学純度、乳酸ポリマー、重合酵素、モノマー供給系酵素

## 1. 研究開始当初の背景

再生可能資源から合成されるバイオベースポリマーの一つ、微生物ポリマーPHAは、モノマー構成ユニットとして150種類以上が知られ、その構造・機能多様性が大きな特徴である。特に、構成するモノマーユニットは、立体化学的に全てR体であり、ポリマーとしての光学純度は極めて高い。我々は、最近ポリマー合成の鍵となるPHA重合酵素に焦点を当てて分子改変を実施し、ランダム変異と独自のスクリーニング系とを組み合わせた進化工学研究を展開している。その結果、千個以上に及ぶ変異体のライブラリーを構築でき、その中から乳酸重合酵素(LPE)が発見されたという経緯がある。この新規エンジニアリング酵素(PHA重合酵素変異体 [*Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PhaC1(S325T/Q481K)変異体])もオリジナル酵素と同様にそのモノマー基質認識は、全てR体である。

## 2. 研究の目的

乳酸ポリマー中の乳酸そのものの立体化学制御(R体からS体への変換)に挑戦する。本プロジェクト遂行のためには、2種類の酵素であるCoA転移酵素とLPEのS体に対する反応性の付与が必須であり、それを同時に実現する。

## 3. 研究の方法

微生物工場として、大腸菌株のJM109と乳酸高蓄積変異体JW0885を使用した。細胞内発現遺伝子として、3HB-CoA供給(乳酸の重合プライミングに必須)に関与する2種酵素(PhaA/B)とLA-CoA供給に関わるCoA転移酵素PCTをコードする遺伝子を目的に応じた発現ベクターに搭載して使用した。さらに、S体乳酸の細胞内合成は、S体選択的LDH遺伝子を導入することで行う。遺伝子操作過程あるいは変異体作成は、DNA配列分析を逐次チェックしながら進めた。微生物培養は、乳酸の生成メカニズムを考慮して、特に通気性とpHをモニタリングしながら行った。ポリマーの細胞からの抽出は、クロロフォルムに溶解後、エタノール沈殿にて行った。ポリマー含量はHPLCおよびGC、分率はGC、GC/MSおよびNMR、分子量はGPC、モノマー配列はNMR、熱的性質はDSC、機械的物性は、引っ張り試験機を使用して測定・分析した。また、重合酵素の精製・活性測定は、既報にしたがって行った。測定の際、コントロールサンプルとして、化学合成PLAも使用し、微生物合成ポリマーとの比較に使用した。PCTとLPEの進化工学は、従来のエラープローンPCR法(突然変異)と色素含有培地をベースとしたプレートアッセイ法(スクリーニング)を利

用した。

## 4. 研究成果

微生物細胞内で乳酸ポリマーを合成するためには、モノマー供給酵素およびモノマー重合酵素遺伝子を導入する必要がある。そこで、まずモノマーの前駆体(初発原料)であるS体乳酸の合成を、S体選択的LDHの遺伝子導入で行った。これについては、ウエスタン分析による翻訳産物の確認、そして菌体外へ放出されたS体乳酸の量を測定することで、その成功を確認した。また、lactyl-CoA(LA-CoA)の供給酵素であるプロピオニルCoA転移酵素(PCT)遺伝子を大腸菌に導入し、CE/MS分析によって、LA-CoAの生産を確認した。続いて、LA-CoAを重合可能な乳酸重合酵素を*in vitro*ポリマー合成系によって探索することにした。本研究では、初代LPEに着目し、多種のPHA重合酵素についてS体LA-CoA重合能力を評価する系立ち上げた。結果、*in vitro*ポリマー合成系においては、LA-CoAと3-hydroxybutyryl-CoA(3HB-CoA:基本的なPHAのモノマー)が共存する場合にのみ、LA-CoA重合能を示すを見出した。本発見は、デザインしたポリマー合成システムを作動させるためのブレイクスルーであった。モノマー供給遺伝子および乳酸重合酵素遺伝子を大腸菌に導入した結果、LA-CoA供給遺伝子のみを導入した場合は、*in vitro*ポリマー合成系の場合と同様に、PLAは検出されなかったが、LA-CoAおよび3HB-CoA供給遺伝子を導入した場合には、乳酸ユニットが6mol%導入されたP(LA-co-3HB)を微生物生産することができた。

さらに、新規乳酸重合酵素の創製に取り組んだ。本システムにおいて、高LA分率の乳酸ベースポリマーを効率的に生産するためには、先に行ったLAモノマー供給の増強という方法以外に、ポリマーを直接重合している重合酵素のLA重合能力を向上させるという方法が考えられる。そこで、新規の変異を乳酸重合酵素に導入することで、重合酵素のLA-CoAに対する基質特異性を増強することを目指した。これまでに唯一見つかった乳酸重合酵素は、野生型PHA重合酵素の3HB-CoA重合能を向上させる変異を2つ導入した2重変異体であった。本知見から、PHA重合酵素における3HB-CoA重合能力をさらに向上させれば、LA-CoA重合能力の増強につながるのではないかと考えた。そこで、3HB-CoA重合能を向上させると報告されていた新規の変異を乳酸重合酵素に導入し、好気培養条件下で、従来の乳酸重合酵素よりも、LA分率およびポリマー蓄積率が向上した新規乳酸重合酵素を創製した。さらに、本研究で見出した新規変異点におけるアミノ酸飽

和変異導入を行うことで、16~45 mol%と幅広い範囲でLA分率が調節されたP(LA-co-3HB)を、再現性よく、高蓄積に微生物合成することができた。以上、乳酸分率を制御できる新たなLPE酵素群を創出することに成功している。問題は、S体選択的反応を示すPCT酵素とLPEの創出は、これから本格的に移行できるステージまで進んだ。

種々の乳酸分率を有する合成ポリマーを精製し、基礎的な熱的性質を調べたところ、乳酸分率の向上に伴いガラス転移温度の上昇が見られた。また、共重合化することで、期待通り軟質性が増すことも初めて明らかとなった。

以上、本研究の成果のインパクトを列挙する。(1)乳酸ポリマーの微生物工場のプロトタイプを構築できた。(2)乳酸分率の向上に代謝と酵素の複合改変が有効であった。(3)合成された新ポリマーは、従来のホモポリマーよりも優れた物性を発現した。

## 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4件) 全て査読有

- (1) F. Shozui, K. Matsumoto, R. Motohashi, M. Yamada, S. Taguchi: Establishment of a metabolic pathway to introduce the 3-hydroxyhexanoate unit into LA-based polyesters via a reverse reaction of  $\beta$ -oxidation in *Escherichia coli* LS5218, *Polymer Degradation and Stability*, **95**, 340-1344, (2010).
- (2) F. Shozui, K. Matsumoto, R. Motohashi, J. Sun, S. Taguchi: Biosynthesis of lactate(LA)-based polyester with a 96 mol% LA fraction and its application to stereocomplex formation, *Polymer Degradation and Stability*, **96**, 499-504, (2011).
- (3) M. Yamada, K. Matsumoto, S. Uramoto, R. Motohashi, H. Abe, S. Taguchi: Lactate fraction dependent mechanical properties of semitransparent poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate)s produced by control of lactyl-CoA monomer fluxes in recombinant *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, **154**, 255-260, (2011).
- (4) Y. Song, K. Matsumoto, M. Yamada, A. Gohda, C. J. Brigham, A. J. Sinsky, S. Taguchi: Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1919-1925, (2012).

1. [学会発表等] (計37件) (代表的な発表を掲載)

1. 一般講演 (計24件)

- (1) K. Matsumoto, M. Yamada, F. Shozui, S. Uramoto, R. Motohashi, T. Nakai, K. Shimizu, S. Taguchi: Microbial Production of Lactate-based Polyesters, 第59回高分子学会年次大会、横浜、2010.5
- (2) 本橋廉、浦本周、山田美和、正瑞文、松本謙一郎、田口精一: ジャーファーマンターを用いた乳酸ポリマーの微生物発酵生産と物性評価、農芸化学会北海道支部 学術講演会、札幌、2010.7
- (3) 正瑞文、本橋廉、山田美和、松本謙一郎、田口精一: 組換え大腸菌を用いたポリ(乳酸-co-3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシヘキサン酸)の生産、日本生物工学会大会、宮崎、2010.10
- (4) M. Yamada, K. Matsumoto, T. Nakai, K. Shimizu, S. Uramoto, F. Shozui, S. Taguchi: Microbial production of lactate (LA)-based polyesters with tailor-made monomer composition using engineered LA-polymerizing enzymes, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, 2010.12
- (5) 渡辺剛志、本橋廉、松本謙一郎、田口精二: Poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)の生合成および物性評価、第45回高分子学会北海道支部会研究発表会、札幌、2011.2
- (6) 孫健、本橋廉、正瑞文、松本謙一郎、田口精一: 乳酸ベース共重合体 P(lactate-co-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)の生合成および物性評価、日本農芸化学会大会、京都、2011.3
- (7) 寺井彩月、正瑞文、松本謙一郎、田口精二: 高乳酸分率のポリ(乳酸-co-3-ヒドロキシブタン酸)[P(LA-co-3HB)]が合成可能な乳酸重合酵素の探索、日本農芸化学会大会、京都、2011.3
- (8) Y. Song, A. Goda, K. Matsumoto, M. Yamada, S. Taguchi: Production of endotoxin-free lactate(LA)-based polyesters in recombinant *Corynebacterium glutamicum*, 日本農芸化学会大会、京都、2011.3
- (9) 寺井彩月、正瑞文、松本謙一郎、大井俊彦、田口精一: ポリ(乳酸-co-3-ヒドロキシブタン酸)[P(LA-co-3HB)]のLA分率向上を目指した *Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PHA 重合酵素の変異体の探索、日本生物工学会大会、東京、2011.9
- (10) J. Sun, R. Motohashi, F. Shozui, K. Matsumoto, S. Taguchi: Biosynthesis of flexible lactate-based copolymers

- incorporating 3-hydroxyvalerate unit in recombinant *Escherichia coli* by feeding of propionate, 日本生物工学会大会、東京、2011.9
- (11) 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、東京、2011.9
- (12) Y. Song, A. Gohda, K. Matsumoto, M. Yamada, S. Taguchi: Biosynthesis of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) in endotoxin-free *Corynebacterium glutamicum* expressing lactate-polymerizing enzyme, 日本生物工学会大会、東京、2011.9
- (13) J. M. Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi: Production of lactate-based polyesters from xylose in *Escherichia coli*, 日本生物工学会大会、東京、2011.9
- (14) 田島健次, 韓雪容, 佐藤康治, 石井綾子, 荒木祐治, 棟方正信, 田口精一: *Pseudomonas* sp. SG4502 由来耐熱性PHA合成酵素と乳酸重合酵素としての利用、第60回高分子討論会、岡山、2011.9.
- (15) Y. Song, A. Gohda, K. Matsumoto, M. Yamada, S. Taguchi: Production of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* expressing lactate-polymerizing enzyme, 2011 Taiwan-Japan Bilateral Polymer Symposium, Taiwan, 2011.9
- (16) 坂井浩平, 寺井彩月, 正瑞文, 越智杏奈, 松本謙一郎, 大井俊彦, 田口精一: 高乳酸分率ポリ(乳酸-co-3-ヒドロキシブタン酸合成のための乳酸重合酵素の進化工学的改変”、農芸化学会北海道支部 学術講演会、札幌、2011.11
- (17) 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、札幌、2011.11
- (18) Y. Song, K. Matsumoto, M. Yamada, A. Gohda, S. Taguchi: Biosynthesis of lactate-based polyester in food-grade bacterium, 高分子学会北海道支部研究発表会、札幌、2012.01
- (19) Y. Song, K. Matsumoto, M. Yamada, A. Gohda, S. Taguchi: A novel microbial production system for lactate-based polyester, The 5th GCOE International Symposium, Hokkaido University, Sapporo, 2012.02
- (20) 越智杏奈, 大場貴史, 坂井浩平, 松本謙一郎, 柘植丈治, 田口精一: 進化工学による新規乳酸重合酵素の探索、日本農芸化学会大会、京都、2012.3
- (21) 孫健, 正瑞文, 松本謙一郎, 田口精一: 組換え大腸菌における不飽和モノマーを導入した乳酸ベースポリマーの生合成、日本農芸化学会大会、京都、2012.3
- (22) 斯波哲史, 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と物性解析、日本農芸化学会大会、京都、2012.3
- (23) Y. Song, K. Matsumoto, M. Yamada, A. Gohda, C. J. Brigham, A. J. Sinskey, S. Taguchi: Direct conversion of glucose into lactate-based polyesters using engineered *Corynebacterium glutamicum* as a whole cell catalyst, 243rd ACS National Meeting, San Diego, USA, 2012.03
- (24) J. M. Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi: Bioconversion of the hemicellulosic sugar, xylose, into lactate-based polyesters using recombinant *Escherichia coli*”, 243rd ACS National Meeting, San Diego, USA, 2012.03
2. 招待講演等 (計 13 件) 無記名は田口単独。
- (1) The microbial factory for synthesis of lactate-based polyester by using lactate-polymerizing enzyme, Finland-Japan Biotechnology Symposium 2010, Turku, Finland, 2010.6.
- (2) 松本謙一郎, 田口精一: “新奇かつデザインブルな バイオポリエステル合成のための重合酵素の機能改変”、第 10 回日本蛋白質科学会年会、ワークショップ、札幌コンベンションセンター、平成 22 年 6 月
- (3) Advanced studies on microbial lactate-based polymers: enzyme-metabolic engineering and polymer properties, ISBP 2010 - International Symposium on Biopolymers, Haus der Wirtschaft, Stuttgart, Germany (Plenary Lecture), 2010.10.
- (4) M. Yamada, T. Nakai, K. Shimizu, S. Uramoto, F. Shozui, K. Matsumoto, S. Taguchi: New mutations in lactate (LA)-polymerizing enzyme for the microbial production of LA-based polyesters with tailor-made monomer composition, ISBP 2010-International Symposium on Biopolymers, Haus der Wirtschaft, Stuttgart, Germany, 2010.10.
- (5) F. Shozui, K. Matsumoto, R. Motohashi, M. Yamada, S. Taguchi: Construction of a metabolic pathway to introduce the 3-hydroxyhexanoate unit into LA-based polyesters via a reverse reaction of  $\beta$ -oxidation in *Escherichia coli* LS5218, ISBP 2010 - International Symposium on

- Biopolymers, Haus der Wirtschaft, Stuttgart, Germany, 2010.10.
- (6) Current advances in microbial cell factories for lactate-based polyesters driven by lactate-polymerizing enzymes, Pacificchem 2010, Biodegradable and Biomass Plastics, Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 2010.12.
- (7) Microbial Plastic Factory: from enzyme-metabolic engineering to polymer properties, Technical Seminar on Bio-Technology in Japan and the Netherlands, Kobe University, 2011.02
- (8) Biological lactate-polymers synthesized by one-pot microbial factory: Enzyme and metabolic engineering, 241st ACS National Meeting & Exposition, Division of Polymer Chemistry, Biobased Monomers, Polymers, and Materials, Anaheim Convention Center & Area Hotels, Anaheim, California, USA, 2011.03.
- (9) Biological Lactate-Polymers Synthesized by One-Pot Microbial Factory: How Different from Chemical Polylactate?, ICMAT 2011-International Conference on Materials for Advanced Technology, Suntec Singapore and the Pan Pacific Singapore Hotel, Suntec, Singapore, 2011.06-07.
- (10) 微生物と植物によるポリエステルの合成: ポリ乳酸から多元ポリ乳酸へ”, 第 8 回よこはまバイオマス研究会講演会、理研横浜研究所、平成 23 年 10 月
- (11) K. Matsumoto, S. Taguchi : Advanced microbial polymer factory for incorporating new monomers: lactate, glycolate and 2-hydroxybutyrate, ICBP2011-The 3rd International Conference on Bio-based polymers 2011, the Meeting Hall of the College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University. Peking University, Beijing, China, 2011.10.
- (12) 「多元ポリ乳酸」創製のための合成生物学－試行錯誤のあれこれ－、セルロース学会北海道・東北支部セミナー「バイオポリマー～合成機構解明から材料応用まで～」、北海道大学工学部、平成 24 年 2 月
- (13) “乳酸バイオポリマー”生産用微生物工場の開発研究、第 7 回農芸化学会研究企画賞受賞者最終報告会、2012 年度産学官学術交流委員会フォーラム、京都女子大学、平成 24 年 3 月

[図書] (計 2 件)

- (1) 田口精一: 乳酸ポリマーのワンポット微生物合成 (バイオプロダクトと新プラットフォーム形成)「エコバイオリファイナリー－脱石油社会へ移行するための環境ものづくり

戦略—」(シーエムシー出版)、pp.237-245、平成 22 年 12 月 ISBN-13: 978-4-7813-0283-6

- (2) 越智杏奈、渡辺剛志、田口精一: “第 1 章 新しい植物由来ポリマー・材料の開発: 9 節 微生物を用いた乳酸ポリマーのワンステップ重合法”、  
「植物由来ポリマー・複合材料の開発」(分担執筆、サイエンス&テクノロジー株式会社)、pp.74-80、平成 23 年 12 月 ISBN-13:978-4-86428-031-0

[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.eng.hokudai.ac.jp/labo/seika/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田口 精一 (TAGUCHI SEIICHI)  
北海道大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号 : 7 0 2 1 6 8 2 8