

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310060

研究課題名(和文) バイオポリエステル分子量低下機構の解明と高分子量体合成への応用

研究課題名(英文) Reduction mechanism of polyhydroxyalkanoate (PHA) molecular weight by class IV PHA synthase

研究代表者

柘植 丈治 (Tsuge, Takeharu)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70332260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陽性細菌 *Bacillus cereus* が有するポリエステル重合酵素が、重合活性と共にエンド型の分解活性を有していることに関して、本研究では、その分解機構がエタノールを用いたアルコールシス分解であることを明らかにした。また、宿主のアルコール代謝を抑制することで、*B. cereus* の重合酵素を用いても高分子量体ポリエステルが合成可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* strains possess class IV PHA synthase, which is composed of the subunits PhaR and PhaC. Recombinant *Escherichia coli* expressing PHA synthase from *Bacillus cereus* (PhaRC) showed an unusual reduction of the molecular weight of PHA produced during the stationary phase of growth. In this study, we revealed that the molecular weight reduction was the result of alcoholytic cleavage of PHA chains by PhaRC induced by endogenous ethanol. This scission reaction was also induced by exogenous ethanol in both in vivo and in vitro assays. By employing the non-ethanol producer as a host, high molecular weight PHA was successfully synthesized even when PhaRC was expressed.

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：ポリヒドロキシアリカン酸 パチルス属細菌 分子量 エンド型分解 組換え大腸菌 PHA重合酵素

1. 研究開始当初の背景

細菌やアーキアの一部は、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) と呼ばれるバイオポリエステルを細胞内に蓄積する。PHA は、これら細菌の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、エネルギー生成に利用される。一方で、PHA は熱可塑性を示し、かつ、生分解性を有することから、環境低負荷型の材料としての利用に注目が集まっている。

これまでに、200 種類以上の微生物において PHA の蓄積が報告されており、60 種以上の微生物から、重合酵素遺伝子が取得・解析されている。これらの PHA 重合酵素は、基質特異性とサブユニット構造から 4 つのクラス (I~IV) に分類することができる。この中で、クラス IV は最近できた新しい分類であり、主に *Bacillus* 属が有する重合酵素が属する。特徴としては、ヘテロサブユニット構造を有し、重合酵素が活性を発現するためには PhaC 以外に PhaR というサブユニットを要求する点にある。このクラスは、分類されて間もないこともあり、酵素学的な基礎研究があまり進んでいない。

一方で、大腸菌は元来 PHA を蓄積しない細菌であるが、PHA 重合酵素とモノマー供給酵素を導入・発現させることで、天然型 PHA 合成細菌と同じように PHA を合成させることができる。興味深いことに、大腸菌によって合成される PHA の分子量は、天然型細菌が合成するものより 10 倍程度大きくなる傾向にある。例えば、クラス I の重合酵素は、通常、重量平均分子量 (M_w) が 30 万~50 万の PHA を合成するが、大腸菌内では 300 万を超える PHA を合成する。これは、大腸菌には PHA 分解酵素や分子量制御機構が備わっていないことが一つの理由と考えられる。分子量が 300 万を超える高分子量体 PHA は、高強度繊維やフィルムに加工することができる高性能なポリエステルである。大腸菌は分子量の高い PHA を生産するための宿主として利用することができるが、PHA 蓄積量が細胞全体の 60% 程度であり、蓄積量の向上が課題となっていた。PHA 蓄積量を 80% まで再現性良く向上させることができれば、コスト競争力が高まり、実用化へのプレイクスルーになると期待される。

我々は、種々の実験を繰り返す中で、クラス IV に属する *Bacillus cereus* 由来重合酵素を大腸菌内で PHA 合成に用いると、再現性良く高い PHA 蓄積量 (80%) が得られることを見出した。一方で、その M_w は 10 万程度と低分子量の PHA であった。さらに詳細に分析した結果、培養初期には高分子量の PHA を合成するが、PHA 合成が停止した培養中期から分子量が著しく低下していくことを突き詰めた。分子量の低下が起きている間のポリマー総量はおおそ変化しておらず、また、分子量の移行期間において広い分散度を示

すことから、PHA 顆粒表面においてエンド型分解を受けているのではないかと推測した。大腸菌には PHA 分解酵素が無いことを考慮すると、*B. cereus* 由来の重合酵素にエンド型分解活性がある可能性が考えられた。重合酵素がエンド型の分解活性を有するという報告はこれまでに無く、全く新規な現象である。

2. 研究の目的

我々は、グラム陽性細菌 *B. cereus* が有する PHA 重合酵素が、PHA の重合活性と共にエンド型の分解活性を有していることを見出した。このような重合酵素による PHA の分解は、*B. cereus* 系の重合酵素以外では報告されていない新規な現象である。一方で、*B. cereus* 由来重合酵素は、大腸菌内で多量の PHA を合成できる優れた酵素でもある。本研究は、この酵素による PHA 分解機構を分子レベルで明らかにし、分解活性が抑制された重合酵素の創出、そして、高分子量体 PHA 合成に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

3-1. PHA の末端構造解析

一般にポリエステル鎖の末端構造は、分解機構を反映する。すなわち、加水分解であれば、カルボキシ末端が生成し、アルコールシス分解であれば、エステル化カルボキシ末端が生成することになる。よって、低分子量化された PHA の末端構造を NMR により解析することで、分解様式に関する重要な手がかりを得ることができる。

3-2. サブユニット置換型酵素による検証

Bacillus 属は、*B. cereus* グループと *B. megaterium* グループの 2 つのサブグループに大別することができる。これらの細菌が有する PHA 重合酵素は、グループ内では非常に高い相同性 (99%) を有するが、グループ間の相同性は若干低下する (70%)。これまでに、*B. cereus* YB-4 株の遺伝子をクローニングし、大腸菌内で PHA 合成を行ったところ、PHA の分子量が経時的に低下することを確認した。一方で、*B. megaterium* の遺伝子についてもクローニングし、大腸菌内で PHA 合成に利用したが、*B. megaterium* の酵素では分子量の低下は確認することができなかった。そこで、PhaC_{Bc} と PhaR_{Bm}、および、PhaC_{Bm} と PhaR_{Bc} (添字は由来を表す) を組み合わせたサブユニット置換型酵素を作成し、大腸菌内で発現させ、PHA の分子量の変化を調べる。これにより、PhaC_{Bc} および PhaR_{Bc} どちらのサブユニットがエンド型分解に関与するのかを明らかにできる。

3-3. インビトロ系による分子量解析

大腸菌を使ったインビボ系の実験だけでは

く、精製した酵素 (PhaC、PhaR) を使ったインビトロ系においても重合実験を行い、ポリエステル分子量の変化を追跡する。インビトロ系で、エンド型分解活性を確認することができれば、最も信頼できる証拠を提示することができる。

3-4 . 活性中心の同定

PhaRC_{Bc} の予想される活性中心を遺伝子工学的にアミノ酸置換し、アルコールシス活性を測定する。予想される活性中心は、ヒドロラーゼの事例から考えて、触媒三残基であるセリン、アスパラギン酸、ヒスチジンである。これらアミノ酸を、アミノ酸配列相同解析に基づき候補を絞り込み、アラニンスキャニングにより活性の消失を調べる。

4 . 研究成果

4-1 . PHA の末端構造解析

PhaRC_{Bc} により低分子量化された PHA ($M_n=2$ 万) の NMR 解析を行った。¹³C-NMR により、末端構造に由来するシグナルを検出した。それらのシグナルは、PHA のカルボキシ末端がエチルエステル化されていることを示しており、PhaRC_{Bc} による分子量低下は、エタノールを用いたアルコールシス分解である可能性が示唆された。¹H-NMR によりエチルエステル末端の定量分析を行ったところ、非常に高い比率で末端がエチルエステル化されており、アルコールシス分解が分子量低下の主要因であることが分かった。この結果を受け、アルコールシス分解は宿主の大腸菌が生産するエタノールによって誘発されていると考えた。そこで、大腸菌を培養する際に、¹³C でラベルされたエタノールを添加することで、アルコールシス分解によりラベル化されたエタノールがポリマー鎖末端に取り込まれるかを調べた。その結果、末端が¹³C でラベル化されたシグナルを確認することができ、アルコールシス分解の証拠を得ることができた。

4-2 . サブユニット置換型酵素による検証

B. cereus と *B. megaterium* の 2 つのクラス IV に属する重合酵素に着目して実験を行った。これらの細菌が有する重合酵素は、*B. cereus* および *B. megaterium* のそれぞれの近縁種間では非常に高い相同性を有するが、*B. cereus* - *B. megaterium* 間の相同性は若干低下する。これまでに、*B. cereus* YB-4 株の遺伝子をクローニングし、大腸菌内で PHA 合成を行い、PHA の分子量が経時的に低下することを確認している。一方で、*B. megaterium* の遺伝子についてもクローニングし、大腸菌内で PHA 合成に利用したが、*B. megaterium* の酵素では、顕著な分子量の低下を確認することができなかった。そこで、PhaC_{Bc} と PhaR_{Bm}、および、PhaC_{Bm} と PhaR_{Bc} を組み合わせさせたサブユ

ニット置換型酵素を作成し、大腸菌内で発現させ PHA の分子量の変化を調べた。その結果、PhaC_{Bc} サブユニットを有する酵素においてのみ、PHA の顕著な分子量低下が観察され、このことから、PhaC_{Bc} サブユニットにアルコールシス分解活性が備わっていることが示唆された。

4-3 . インビトロ系による分子量解析

PhaRC_{Bc} を用いたインビトロアッセイ系を立ち上げ、分子量低下がインビトロでも確認できるのかを検証した。まず、His-tag が付いた PhaC_{Bs} および PhaR_{Bs} を大腸菌内で発現させ、アフィニティーカラムを用いて精製した。モノマーとなる (R)-3HB-CoA は、試薬の (R)-3HB と CoA リチウム塩を用いて化学的に合成し、精製・濃縮して調製した。アッセイ法としては、先に PhaRC_{Bs} にモノマーを与えて 3 分間重合反応を行い、遠心分離によりポリエステル - PhaRC_{Bs} 複合体を回収し、サンプル A ~ C に 3 等分した。サンプル A は、乾燥させ、そのまま分子量測定に供した。サンプル B は、モノマーを含まないリン酸緩衝液に懸濁した。サンプル C は、モノマーは含まないがエタノールを含むリン酸緩衝液に懸濁した。サンプル B と C は、24 時間インキュベートした後、分子量測定に供した。各サンプルの分子量を比較した結果、エタノールを添加したサンプル C においてのみ顕著な分子量低下が観察され、インビトロ系においてもアルコールシス反応を再現することができた。これにより、アルコールシス反応には PhaRC_{Bc} 以外の酵素は関与していないことを証明することができた。

4-4 . 活性中心の同定

アルコールシス活性中心を同定するためのインビボアッセイ系を構築した。すなわち、大腸菌を宿主にして、*Delftia acidovorans* 由来の重合酵素と PhaRC_{Bs} を共発現させ、合成される PHA の分子量を測定することでアルコールシス活性の有無を判断した。このアッセイ系において *D. acidovorans* の重合酵素は分子量の高い PHA を合成し、PhaRC_{Bs} によるアルコールシス分解のための基質を供給する役目を担う。アミノ酸配列の相同性解析から候補となるアミノ酸残基を選び、アラニンスキャニングにより変異体を作成し、インビボアッセイ系に供した。その結果、重合活性中心と同じアミノ酸残基において、アルコールシス活性が消滅することが分かり、同じ活性中心が重合反応とアルコールシス反応を担っていることが示唆された。

最終的な目標は、PhaRC_{Bs} による高分子量 PHA の合成であるが、同じ活性中心を共有していることから重合酵素の改変によるアルコールシス活性の抑制は不可能であることが判明した。一方で、宿主のアルコール生産を抑制すれば PhaRC_{Bs} を用いても高分子量の PHA が合成できることが分かり、当初想定し

ていた手法とは異なるが、高分子量体合成を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 5 件)

Manami Hyakutake, Satoshi Tomizawa, Kouhei Mizuno, Hideki Abe, Takeharu Tsuge:
Alcoholytic cleavage of polyhydroxyalkanoate chains by class IV synthases induced by endogenous and exogenous ethanol, *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 1421-1429, 2014. 査読有
DOI 10.1128/AEM.03576-13

Ayaka Hiroe, Kazunori Ushimaru, Takeharu Tsuge:
Characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase derived from *Delftia acidovorans* DS-17 and the influence of PHA production in *Escherichia coli*, *J. Biosci. Bioeng.*, 115, 633-638, 2013. 査読有
DOI 10.1016/j.jbiosc.2012.12.015

Kazunori Ushimaru, Smith Sangiambut, Nicholas Thomson, Easan Sivaniah, Takeharu Tsuge:
New insights into activation and substrate recognition of polyhydroxyalkanoate synthase from *Ralstonia eutropha*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97 1175-1182, 2013. 査読有
DOI 10.1007/s00253-012-4089-x

Satoshi Tomizawa, Manami Hyakutake, Yuta Saito, Jumiarti Agus, Kouhei Mizuno, Hideki Abe, Takeharu Tsuge:
Molecular weight change of polyhydroxyalkanoate (PHA) caused by the PhaC subunit of PHA synthase from *Bacillus cereus* YB-4 in recombinant *Escherichia coli*, *Biomacromolecules*, 12, 2660-2666, 2011. 査読有
DOI 10.1021/bm2004687

Manami Hyakutake, Yuta Saito, Satoshi Tomizawa, Kouhei Mizuno, Takeharu Tsuge:
Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by class IV PHA synthases employing *Ralstonia eutropha* PHB4 as host strain, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 2660-2666, 2011. 査読有
DOI 10.1271/bbb.110229

〔学会発表〕(計 10 件)

百武真奈美、水野康平、柘植丈治：
ポリエステル重合酵素が示すエステル分解

能に関与するアミノ酸の探索、日本農芸化学会、2014年3月28日、明治大学

Manami Hyakutake, Satoshi Tomizawa, Kouhei Mizuno, Hideki Abe, Takeharu Tsuge:
Novel ester degradation activity of class IV polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus cereus* YB-4, The 4th International Conference on Biobased Polymers, 2013年9月25日~2013年9月28日, Hanyang University (Seoul, Korea)

百武真奈美、富澤哲、水野康平、柘植丈治：
Bacillus cereus 由来 PHA 重合酵素が示す新規
エステル分解能、日本生物工学会、2013年9
月20日、広島国際会議場

百武真奈美、富澤哲、水野康平、柘植丈治：
クラスIV重合酵素が示すPHA分子量低下能
とその発現因子の解明、日本生物工学会大会、
2012年10月24日、神戸国際会議場

Takeharu Tsuge:
Unusual property of class IV polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus cereus* YB-4, International Symposium of Biopolymer, 2012年10月9日, Cairns, Australia

Manami Hyakutake, Satoshi Tomizawa, Takeharu Tsuge:
Factors affecting PHA molecular weight decrease in recombinant *Escherichia coli* expressing *Bacillus cereus* YB-4 synthase, International Symposium of Biopolymer, 2012年10月9日, Cairns, Australia

百武真奈美、富澤哲、斉藤雄太、柘植丈治：
バチルス属由来重合酵素における特異的な
PHA分子量低下機構の解析、第61回高分子
学会、平成24年5月31日、パシフィコ横浜

Satoshi Tomizawa, Manami Hyakutake, Yuta Saito, Jumiarti Agus, Kouhei Mizuno, Hideki Abe, Takeharu Tsuge:
Molecular weight change of polyhydroxyalkanoate (PHA) caused by PhaC subunit of class IV PHA synthase in recombinant *Escherichia coli*, The 3rd International Conference on Bio-Based Polymers, 2011年10月19日, 中国・北京大学

Manami Hyakutake, Satoshi Tomizawa, Yuta Saito, Kouhei Mizuno, Takeharu Tsuge:
Substrate specificity and producing ability of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases from *Bacillus cereus* YB-4 and *Bacillus megaterium*, The 3rd International Conference on Bio-Based Polymers, 2011年10月19日, 中国・北京大学

百武真奈美、富澤哲、斉藤雄太、柘植丈治：
Bacillus cereus 重合酵素によるバイオポリエ

ステルの生合成と特異な分子量低下現象、第60回高分子討論会、平成23年9月28日、岡山大学

〔図書〕(計 1件)

柘植丈治、富澤哲：微生物合成ポリエステル
の分子量とその影響因子、化学工業、62、
230-234、2011.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称：低分子量ポリヒドロキシアルカン酸の
製造方法

発明者：柘植丈治、百武真奈美、富澤哲、鈴
木紀之、松本圭司

権利者：東京工業大学、カネカ

種類：特許

番号：特願 2013-162731

出願年月日：平成25年8月5日

国内外の別：国内

○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

6. 研究組織

(1)研究代表者

柘植 丈治 (Tsuge, Takeharu)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・
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