

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23681015

研究課題名(和文)多様なバイオポリエステルを合成する資源循環型フレックス微生物工場の開発

研究課題名(英文)Microbial production of unusual biopolyesters

研究代表者

松本 謙一郎 (MATSUMOTO, KENICHIRO)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80360642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,600,000円、(間接経費) 6,480,000円

研究成果の概要(和文)：ある種の微生物は細胞内にポリエステルを蓄積することが知られ、このポリマーはプラスチックの物性を示すことから、バイオベースプラスチックの候補物質として期待される。しかし、天然で合成される3-ヒドロキシ酪酸から構成されるポリマーは、脆性を示すことから応用例が限定的であった。本研究課題では、人工的に改変したポリエステル生合成系を用いて、種々の非天然ポリエステルを合成し、その物性を明らかにした。とくに、2-ヒドロキシ酪酸のポリマーの微生物合成では、機械物性が評価できる程度の量のポリマーの合成に初めて成功した。本ポリマーは優れた透明性と伸張性を持っており、天然型のポリマーとは全く異なる物性を示した。

研究成果の概要(英文)：Bacterial polyhydroxyalkanoates (PHAs) are intracellular storage material, which can be used as a biobased plastic. The most common PHA is P(3-hydroxybutyrate), which has been found in a variety of bacteria and produced with good yield. However, the brittleness of the polymer has limited the practical use of the material. This study addressed this problem by using engineered polymer synthetic systems, which are capable of synthesizing unusual PHAs. For examples, the isotactic P(2-hydroxybutyrate) was efficiently produced using engineered *Escherichia coli*. The microbial process had an advantage over the chemical polymerization in that the enzymatic polymerization is capable of synthesizing isotactic polymer from inexpensive racemic precursor. The polyester exhibited excellent transparency and flexibility, which differed from conventional PHAs. The glycolate-based polyester also produced using *E. coli*. This was the first case for the intracellular polymerization of glycolate.

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：バイオベースプラスチック

### 1. 研究開始当初の背景

プラスチックは、現代社会に欠かせない有用な材料である。しかし近年、二酸化炭素排出量の削減が大きな社会目標とされるなか、石油を原料として合成されるプラスチック産業においても、石油使用料の削減が重要な課題となっている。そのための有力な方法の一つは、プラスチックを合成する原料を石油からバイオマスへ変換することである。中でも、ポリ乳酸 (PLA) は、デンプンを出発原料として、乳酸発酵による乳酸の発酵と、得られた乳酸の化学重合を経て合成されるポリマーであり、高い透明性と優れた加工特性を持ち、現在最も利用が進んでいるバイオプラスチックである。しかしながら、原料としてデンプンを使用することは、食糧供給との競合の観点から好ましくないと指摘されており、また、PLA は硬質性の材料であるため、柔軟性が要求される用途には使用できず、使用用途が限定されていた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、遺伝子工学を駆使して創成される組換え微生物によるバイオポリマー合成系を用いて、上述の問題にアプローチする事を検討した。まず、原料の問題に取り組んだ。我々の研究グループでは、既往の研究において、微生物のポリエステル合成系を改変する事により、細胞内で乳酸を重合し、乳酸ポリマーを生合成するプロセスを構築していた。既往の研究では、モデル系としてグルコースを炭素源として実験を行っていた。しかし、非可食バイオマスを炭素源として使用する事を想定した場合、グルコースに加えて、ヘミセルロースに由来するキシロースを利用することになる。そこで、キシロースを炭素源とした乳酸ポリマー生合成について検討を加えた。また、乳酸ポリマーの物性を拡張するため、乳酸と 3-hydroxyalkanoate の共重合体の合成を検討した。これらに加えて、本生合成系を応用することにより、これまで微生物合成が不可能であった多様な新規バイオポリマーを合成し、乳酸ポリマーとは異なる物性を持つバイオマテリアルを探索することを目的とした。具体的には、グリコール酸、2-hydroxybutyrate (2HB) をモノマーユニットとするポリエステルの生合成を検討した。

### 3. 研究の方法

乳酸ポリマーの合成に必要なモノマー供給系酵素遺伝子群および重合酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌を作成し、キシロースを主炭素源とした培地で培養し、経時的に炭素源の消費量および生産された物質の種類と濃度を測定した。ポリマーの蓄積量は、細胞からポリマーを抽出した後にモノマー単位に分解してガスクロマトグラフィーにより定量した。培地中の分泌成分は、培地上清の HPLC 分析により定量した。ポリマーの構

造 (重合パターン) は NMR により測定した。ポリマー合成に利用される重要な中間体である NADPH は、酵素法により測定した。

グリコール酸ポリマーの合成では、組換え大腸菌を作成し、グリコール酸を含む培地で培養することにより、グリコール酸を細胞内に取り込ませ、さらに重合してポリエステルが合成される。得られたポリマーは、前述した乳酸ポリマーと同様の方法で分析した。培地中のグリコール酸濃度は、HPLC にて定量した。

2HB ポリマーの合成では、2HB を培地中に添加して組換え大腸菌を培養してポリマーを合成した。他のポリマー同様に、ポリマーの組成・蓄積率を測定した。ポリマーの前駆体として、R,S の混合物であるラセミ体を使用した。蓄積されたポリマーの立体化学は、ポリマーを加水分解した後に、光学分離カラムを用いた HPLC により決定した。得られたポリマーの熱的性質は DSC により測定した。ポリマーの機械的物性は、ソルベントキャスト法によりフィルムを作成し、引張り試験を行う事により測定した。

### 4. 研究成果

大腸菌はキシロースの資化性を有し、キシロースを炭素源として物質生産を行う事ができるが、一般にその生産性は、グルコースを炭素源とした場合よりも低くなる事が知られている。例えば、典型的な微生物産生ポリエステルである P(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] の合成では、組換え大腸菌を用いて、グルコースまたはキシロースを炭素源として培養すると、グルコースを用いた場合の方が、生産性が高くなる。

一方、乳酸ポリマー P(LA-co-3HB) の生合成系を導入した組換え大腸菌を、キシロースを炭素源として培養したところ興味深い結果が得られた。まず第一に、キシロースを炭素源とすると、グルコースを炭素源とした場合よりも、乳酸分率の高いポリマーが合成される。さらに、P(LA-co-3HB) の生産性は、同条件で得られる P(3HB) の生産性よりも高い。これは、乳酸ポリマーが天然では合成されない非天然ポリエステルである事を考えると驚くべき結果である。この生産性の向上は、グルコース、キシロースの両炭素源で見られるが、両者の乳酸ポリマー生産性の差は、P(3HB) の生産量の差よりも少なくなる。第二に、グルコースは培養によりすべてが利用されず、培養終了時にわずかに培地中に残るのに対して、キシロースは残らず消費される。このため、グルコースをさらに高濃度で添加しても、残留量が増えるだけなのに対して、キシロースを高濃度で加えると、より多くの炭素源が消費され、その結果、より多くのポリマーが作られる。この効果により、キシロースを用いて得られるポリマーの最終的な生産性は、グルコースを用いた場合よりも高くなることを見出した。各種条件を最適化す

ることにより、これまで糖を炭素源として合成された微生物産生ポリエステルとして、最大の生産性を達成した。

これらの結果に加えて、大腸菌の乳酸合成に関わる代謝改変株を用いたポリマー合成を行った。乳酸の合成が促進される事が知られている遺伝子改変株を用いて培養を行ったところ、いくつかの株で、乳酸分率がさらに向上したポリマーの合成が出来る事がわかった。しかしながら、一部の菌ではポリマーの合成量が低下し、乳酸の合成と乳酸ポリマーの合成は、必ずしもパラレルにならないことが示された。

次に、乳酸ポリマー生合成の知見を応用して、微生物合成では初となるグリコール酸ポリマーの合成に挑戦した。グリコール酸は乳酸と類似の化学構造を有するため、乳酸ポリマーの合成系を用いて、同様に合成できると考え、培養を行った。しかしながら、所定の組換え株をグリコール酸添加培地で培養しても、グリコール酸ポリマーは得られなかった。種々の条件検討の結果、第二の炭素源として脂肪酸を添加すると、組換え大腸菌にグリコール酸ポリマーを合成される事ができると分かった。グリコール酸ポリマーの生合成は初めての報告例となるため、ポリマー構造を慎重に分析した。<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR および COSY NMR 解析により、モノマーとは異なる特異的なピークが観察され、そのケミカルシフトからグリコリルユニットであると帰属できたため、ポリマー中にグリコール酸が取り込まれたと結論付けた。しかしながらこの方法では、得られるポリマー量が極めて少なかった。そこで培養条件を改良することにより、より効率的にポリマーを合成する方法を確立した。本方法を用いて合成したグリコール酸ポリマーを抽出・精製することでソルベントキャストフィルムを作成した。このポリマーを用いて、生合成グリコール酸ポリマーの物性を初めて測定することができた。

続いて 2HB ポリマーの生合成に取り組んだ。2HB ポリマーの合成のために、必要な遺伝子を導入した組換え大腸菌を、R,S のラセミ 2HB を含む培地で培養した。培養中の培地上清を分析した結果、添加した 2HB が菌体に取り込まれている事が分かった。培養終了後に、菌体からポリマーを抽出して、ポリマー分析を行った。その結果、有意なポリマー蓄積が確認できたが、得られたポリマーは消費された 2HB よりも少なかったことから、一部の前駆体は菌によって消費された事が示唆された。得られたポリマーの NMR 解析により、確かに重合物が得られている事が確認できた。ポリマーを水酸化ナトリウム溶液で加水分解することにより、モノマー単位に分解し、光学分離カラムを装備した HPLC に供した。その結果、得られたポリマーはほぼ R 体の 2HB のみから構成される事が分かった。すなわち、微生物システムを用いて、R,S のラセミ体か

らキラルポリマーが合成できた。この事実は、NMR 分析の結果とも一致した。得られたポリマーを用いてソルベントキャストフィルムを作成した。得られたポリマーは、ポリ乳酸と同様に、ほぼ完全に透明なフィルムになった。しかし、ポリ乳酸とは対照的に、非常に柔らかく軟質性のポリマーが得られた。ポリ乳酸のフィルムは引張るとほとんど伸びずに断裂するのに対し、2HB ポリマーのフィルムは元の長さの倍以上に伸張する事ができた。このことから、ポリ乳酸と P(2HB) は、構造は類似しているものの、その物性は大きく異なる事が分かった。さらに、培養条件を調整することにより、P(2HB) に乳酸ユニットが導入された共重合体の合成にも成功した。ポリマー中に導入される乳酸ユニットの割合は、培養条件の好気・嫌気を調整することにより制御可能であった。乳酸・2HB 共重合体は、P(2HB) よりもわずかに硬質化した。この事から、乳酸ユニットの導入により物性の調節が出来ることが分かった。

#### 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)

(雑誌論文)(計4件)

1. John Masani NDUKO, Ken'ichiro MATSUMOTO, Toshihiko OOI, Seiichi TAGUCHI: "Enhanced production of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) from xylose in engineered Escherichia coli overexpressing a galactitol transporter", Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.98. pp.2453-60, 2014 査読あり
2. John Masani NDUKO, Ken'ichiro MATSUMOTO, Toshihiko OOI, Seiichi TAGUCHI: "Effectiveness of xylose utilization for high yield production of lactate-enriched P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using a lactate-overproducing strain of Escherichia coli and an evolved lactate-polymerizing enzyme", Metab. Eng., Vol.15, pp.159-166, 2013 査読あり
3. Ken'ichiro MATSUMOTO, Satsuki TERAJ, Ayako ISHIYAMA, Jian SUN, Taizo KABE, Yuyang SONG, John NDUKO, Tadahisa IWATA, Seiichi TAGUCHI: "One-pot microbial production, mechanical properties and enzymatic degradation of isotactic P[(R)-2-hydroxybutyrate] and its copolymer with (R)-lactate", Biomacromolecules, Vol.14, pp.1913-1918, 2013 査読あり
4. Ken'ichiro MATSUMOTO, Ayako ISHIYAMA, Kohei SAKAI, Tetsufumi

SHIBA, Seiichi TAGUCHI:  
"Biosynthesis of glycolate-based  
polyesters containing  
medium-chain-length  
3-hydroxyalkanoates in recombinant  
Escherichia coli expressing engineered  
polyhydroxyalkanoate synthase", J.  
Biotechnol., Vol.156(3), pp.214-217,  
2011 査読あり

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 加部泰三、松本謙一郎、引間孝明、丸林弘典、高田昌樹、田口精一、岩田忠久：“微生物産生ポリ[(R)-ラクテート-co-(R)-2-ヒドロキシブチレート]の結晶性および熱的性質”，第 63 回高分子学会年次大会、名古屋、2014.5.29
2. 三宅政裕、松本謙一郎、寺井彩月、加部泰三、岩田忠久、田口精一：“微生物を利用したキラル P(2-ヒドロキシ酪酸)の合成とポリマー解析”，日本農芸化学会 2014 年度大会、東京、2014.3.28
3. John Masani Nduko, Ken'ichiro Matsumoto, Toshihiko Ooi, Seiichi Taguchi: "Efficient production of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using hemicellulose-derived sugar, xylose, in engineered Escherichia coli overexpressing a galactitol transporter", Frontier Chemistry Center International Symposium 2013 "Advanced Materials Science", Sapporo, 2013.12.10
4. 松本謙一郎、越智杏奈、大場貴史、高谷真宏、田口精一：“ポリヒドロキシアリカン酸重合酵素の機能改変によるポリマー構造制御”，日本生物工学会大会、広島、2013.9.19
5. 斯波哲史、松本謙一郎、田口精一：“糖を利用した組換え大腸菌でのグリコール酸ベースポリマーの生産”，日本生物工学会大会、広島、2013.9.19
6. 崔允圭、松本謙一郎、田口精一：“不飽和モノマーを導入した 2-ヒドロキシブタン酸ベースポリマーの生合成とその応用”，日本生物工学会大会、広島、2013.9.19
7. 三宅政裕、寺井彩月、松本謙一郎、加藤泰三、岩田忠久、田口精一：“2-ヒドロキシブタン酸ベースポリマーの微生物合成とその物性解析”，日本生物工学会大会、広島、2013.9.19
8. Ken'ichiro Matsumoto, Jian Sun, Seiichi Taguchi: "Microbial synthesis of isotactic P(2-hydroxybutyrate) from racemic precursor and its property analysis", The 13th Pacific Polymer Conference, Taiwan, 2013.11.19
9. 青木駿介、大場貴史、越智杏奈、松本謙一郎、田口精一：“改変型重合酵素によ
- る 2-ヒドロキシブタン酸ベースポリマーの生合成と物性解析”，日本農芸化学会 2013 年度大会、仙台、2013.3.26
10. John Masani Nduko, Ken'ichiro Matsumoto, Toshihiko Ooi, Seiichi Taguchi: "Efficient bioconversion of lignocellulosic biomass-derived sugars into poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) by metabolically engineered Escherichia coli.", 15th IBS, Daegu, Korea, 2012.9.18
11. John Masani Nduko, Ken'ichiro Matsumoto, Yuyang Song, Seiichi Taguchi: "Microbial plastic factory: Synthesis and properties of the new lactate-based and related biopolymers", The 244th ACS National Meeting & Exposition, Philadelphia, Pennsylvania, 2012.8.20
12. Nduko John Masani, Ken'ichiro Matsumoto, Seiichi Taguchi: "Biosynthesis and properties of advanced biopolymers containing lactate by metabolically engineered bacteria", The 244th ACS National Meeting & Exposition, Philadelphia, Pennsylvania, 2012.8.20
13. John Masani Nduko, Ken'ichiro Matsumoto, Toshihiko Ooi, Seiichi Taguchi: "Lactate-based polyesters production by recombinant bacteria using lignocellulosic biomass sugars as carbon sources", Japan-Chica-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Kanazawa, 2012.5.29
14. 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”，農芸化学会 2012 年度大会、京都、2012.3.25
15. 石山絢子、斯波哲史、松本謙一郎、田口精一：“組換え大腸菌によるグリコール酸ベースポリマーの生合成”，高分子学会北海道支部研究発表会、札幌、2012.1.29
16. Ken'ichiro Matsumoto, Seiichi Taguchi: "Expanding microbial polyesters: syntheses and properties", ISBP, Australia, 2012.10.7
17. 寺井彩月、石山絢子、松本謙一郎、田口精一：“2-ヒドロキシブタン酸ベース新規バイオプラスチックの微生物合成と物性解析”，日本生物工学会大会、神戸、2012.10.25
18. 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、2011.11.5

19. John Masani Nduko, Ken'ichiro Matsumoto, Toshihiko Ooi, Seiichi Taguchi: " Production of lactate-based polyesters from xylose in Escherichia coli " 日本生物工学会大会、東京、2011.9.27

〔図書〕(計0件)

〔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/](http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/seika/TOP.html)  
TOP.html

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 謙一郎 (MATSUMOTO, Ken'ichiro)  
北海道大学・工学研究院・生物機能高分子  
部門  
研究者番号：80360642

### (2) 研究分担者

(なし)

研究者番号：

### (3) 連携研究者

(なし)

研究者番号：